

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Ingeniería Química

**MATRICES POROSAS BASADAS EN POLÍMEROS  
BIODEGRADABLES COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE  
FÁRMACOS**



**Memoria i Annexos**

<b>Autor:</b>	Alberto Stampa Sarrias
<b>Director:</b>	Luis Javier Del Valle
<b>Co-Director:</b>	Jordi Puiggalí
<b>Convocatoria:</b>	Septiembre 2019



## Resum

Les matrius poroses basades en polímers biodegradables van ser desenvolupades com *scaffolds* temporals, i tenen interès al sector biomèdic com suport per la regeneració i reparació de teixits. Les matrius poroses es caracteritzen per la interconnexió entre els seus porus i una ràtio elevada entre la seva àrea superficial i la seva massa o volum. Aquestes característiques permeten la adhesió i proliferació d'un major nombre de cèl·lules degut al seu major trànsit cel·lular i oferta de nutrients dins de la matriu. A l'actual projecte, s'estudia de forma comparativa tres matrius poroses: un hidrogel preparat per entrecreuament, una matriu de microfibrilles preparada per *electrospinning*, i una matriu porosa preparada per *solving-casting* i agent porogènic.

L'hidrogel ha sigut preparat amb una nova polièsteramida (PEA) denominada PEA-4F4, sintetitzada per mitjà d'una polimerització interfacial a partir de clorur de succinil (4C), l'aminoàcid fenilalanina (F), i el cis-1,4-butenediol (4C) y, com agent entrecreuant s'ha utilitzat el polietilenglicol diacrilat (PEG-DA). La matriu de fibres anava a ser preparada amb la PEA-8L6 (dièster de 8C, aminoàcid de leucina i diol de 6C), però amb la finalitat d'obtenir una matriu amb millors propietats tèrmiques, ha sigut preparada a amb l'ús de la tècnica d'*electrospinning* a partir d'una mescla del polièster *Bionolle* i la PEA-8L6 (BIO:PEA-8L6 50:50 wt%). Per la obtenció de les fibres ha sigut necessària una prèvia estandardització dels paràmetres operacionals (ex., concentració de la solució, voltatge aplicat, flux de la dissolució ...). Finalment, la matriu amb agent porogènic (NaCl) ha sigut preparada per evaporació del solvent (Cloroform) d'una dissolució de BIO:PEA-8L6:NaCl 25:25 wt% a la qual es resuspèn partícules de NaCl al 50 wt%.

Tots els compostos precursors a la elaboració del hidrogel, han sigut analitzats estructuralment per mitjà de FT-IR i RMN i totes les matrius poroses finals s'han analitzat únicament per mitjà de FT-IR. Seguidament, per estudiar les propietats tèrmiques de les fibres amb l'adició del *Bionolle* s'ha realitzat un estudi tèrmic per DSC abans i després d'afegir el polièster. La morfologia de les matrius poroses a sigut caracteritzada per mitja de SEM.

Finalment, aquestes matrius han sigut carregades amb curcumina, que tenen activitat antitumoral, per estudiar el seu ús com sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs en un medi de PBS:EtOH al 70 vt% d'Etanol.

## Resumen

Las matrices porosas basadas en polímeros biodegradables fueron desarrolladas como *scaffolds* temporales, y tienen interés en el sector biomédico como soporte para la regeneración y reparación de tejidos. Las matrices porosas se caracterizan por la interconexión entre sus poros y una ratio elevada entre su área superficial y su masa o volumen. Estas características permiten la adhesión y proliferación de un mayor número de células debido a su mayor tránsito celular y oferta de nutrientes dentro de la matriz. En el actual proyecto se ha estudiado de forma comparativa tres matrices porosas: un hidrogel preparado por entrecruzamiento, una matriz de microfibras preparada por *electrospinning*, y una matriz porosa preparada por *solving-casting* y agente porogénico.

El hidrogel ha sido preparado con una nueva poliesteramida (PEA) denominada PEA-4F4 sintetizada mediante una polimerización interfacial a partir de cloruro de succinilo (4C), el aminoácido fenilalanina (F), y el cis-1,4-Butendiol (4C) y, como agente entrecruzante se ha utilizado el polietilenglicol diacrilato (PEG-DA). La matriz de fibras iba a ser preparada con la PEA-8L6 (diéster de 8 C, aminoácido de leucina y diol de 6C), pero con el fin de obtener una matriz con mejores propiedades térmicas, ha sido preparada con el uso de la técnica de *electrospinning* a partir de la mezcla del poliéster *Bionolle* y la PEA-8L6 (BIO:PEA-8L6 50:50 wt%). Para la obtención de las fibras ha sido necesaria una previa estandarización de los parámetros operacionales (ej., concentración de la solución, voltaje aplicado, flujo de la disolución ...). Finalmente, la matriz con agente porogénico (NaCl) ha sido preparada por evaporación del solvente (Cloroformo) de una disolución de BIO:PEA-8L6:NaCl 25:25 wt% en la cual se resuspende partículas de NaCl al 50 wt%.

Todos los compuestos precursores a la elaboración del hidrogel, han sido analizados estructuralmente mediante FT-IR y RMN y todas las matrices porosas finales se han analizado únicamente mediante FT-IR. Seguidamente, para estudiar las propiedades térmicas de las fibras con la adición del *Bionolle* se ha realizado un estudio térmico mediante DSC antes y después de añadir el poliéster. La morfología de las matrices porosas ha sido caracterizada por medio de SEM.

Finalmente, estas matrices han sido cargadas con curcumina, que tiene actividad antitumoral, para estudiar su uso como sistemas de liberación controlada de fármacos en un medio de PBS:EtOH al 70% de Etanol en volumen.

## Abstract

The porous matrices were developed as temporal scaffolds and their role in the biomedical sector is to serve as support for the repair and regeneration of tissues. The porous matrices are characterized by the interconnection between their pores and a high ratio between their superficial area and their mass or volume. Such characteristic allows for the adherence and proliferation of higher number of cells due to its higher cell transit and nutrient offer within the matrix. In the present project it has been studied, in a comparative manner, three pore matrices: a crosslinked produced hydrogel, an electrospinning produced microfiber matrix and, thirdly, a porous matrix prepared by solving-casting and porogenic agent.

The hydrogel has been produced thanks to a new poliesteramide (PEA) known as PEA-4F4 synthesized by an interfacial polymerization from succinyl chloride (4C), the amino acid phenylalanine (F), and cis-1,4-butenediol (4C) and, as crosslinking agent it has been used PEG-DA. In the first instance, the fiber matrix was going to be produced by PEA-8L6 (diester of 8C, amino acid of leucine and diol of 6C), but in order to obtain a matrix with better thermal properties, it has been produced using the electrospinning technique from the Bionolle polyester and PEA-8L6 mixture (BIO:PEA-8L6 50:50 wt%). For the attainment of fibers, a previous standardization of operational parameters has been necessary (ex., Solution concentration, applied voltage, dissolution flux ...). Finally, the matrix with porogenic agent (NaCl) has been produced by evaporation of the solvent of a BIO:PEA:NaCl 25:25 wt% dissolution in which 50 wt% NaCl particles are resuspended.

All compounds that proceed the elaboration of the hydrogel have been structurally analyzed using FT-IR and RMN and all the final porous matrices have been analyzed using only FT-IR. Next, to study the thermal properties of the fibers with the addition of Bionolle it has been done a thermal study using DSC before and after adding the polyester. The porous matrix's morphology has been characterized using SEM.

Finally, these matrices have been charged with curcumin, a substance that has antitumoral activity, in order to study its use as controlled drug delivery systems in a medium of PBS:EtOH 70 vt% of Ethanol.

## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor, Luís J. del Valle y a mi co-tutor, Jordi Puiggali, por toda la atención y apoyo mostrado durante todo el proyecto. Siempre dispuestos a resolver cualquier duda surgida a lo largo de este tiempo con buena cara. A Angelica, por todo el trabajo que nos ha facilitado y el tiempo que ha dedicado con nosotros en el laboratorio y, en general, a todos los doctorados de la planta 2 por crear un buen ambiente en el laboratorio y hacer más fácil los días.

También, gracias a mi familia y amigos, que me han apoyado a lo largo de toda la carrera.

## Glosario

<b>BIO</b>	Bionolle
<b>DMA</b>	Dimetilacetamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DSC</b>	Calorimetría diferencial de barrido
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FT-IR</b>	Espectroscopia infrarroja
<b>PBS</b>	Tampón fosfato Salino
<b>PCL</b>	Policaprolactona
<b>PEA</b>	Poliesteramida
<b>PEA-4F4</b>	Poliesteramida constituida por el cloruro de succinilo (4C), el amino ácido L-Fenilalanina (F) y el 1,4-cis-Butenodiol (4C)
<b>PEA-8L6</b>	Poliesteramida constituida por el ácido sebácido (8C), el amino ácido L-Leucina (L) y el 1,6-Hexanodiol (6C)
<b>PEG-DA</b>	Polietilenglicol diacrilato
<b>PGA</b>	Ácido poliglicólico
<b>PLA</b>	Ácido poliláctido
<b>Q</b>	Grado de hinchamiento del hidrogel (%)
<b>RMN</b>	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
<b>ROP</b>	Reacciones por apertura del anillo
<b>SEM</b>	Microscopio electrónico de barrido
<b>T<sub>f</sub></b>	Temperatura de fusión
<b>T<sub>g</sub></b>	Temperatura de transición vítrea



<b>TosOH</b>	Ácido p-toluensulfónico
<b>UV</b>	Ultravioleta-visible
<b>W<sub>d</sub></b>	Peso en húmedo del hidrogel (g)
<b>W<sub>s</sub></b>	Peso en seco del hidrogel (g)



# Índice

<b>RESUM</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>IV</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>V</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
1.1. Polímeros	10
1.1.1. Polímeros biodegradables	14
1.2. Aplicaciones biomédicas	19
1.2.1. Liberación de fármaco controlada	20
<b>2. OBJETIVOS DEL TRABAJO</b>	<b>23</b>
2.1. Objetivos específicos	23
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1. Hidrogel de PEA-4F4:PEG-DA	25
3.1.1. Material	25
3.1.2. Poliesteramida PEA-4F4	25
3.1.3. Polímero PEG-DA	28
3.1.4. Síntesis y carga hidrogel PEA-4F4:PEG-DA	29
3.2. Matriz de fibras	30
3.2.1. Material	30
3.2.2. <i>Electrospinning</i>	30
3.3. Matriz porosa de PEA-8L6:BIO mediante <i>salt-leaching</i>	33
3.3.1. Material	33
3.3.2. Matrices porosas mediante <i>salt-leaching</i>	33
3.4. Caracterización física y química	35
3.4.1. Espectroscopia magnética nuclear (RMN)	35
3.4.2. Espectroscopia magnética infrarroja (FT-IR)	35
3.4.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	36
3.5. Caracterización morfológica	37
3.5.1. Microscopio electrónico de barrido (SEM)	37
3.6. Carga de fármaco y análisis de la velocidad de liberación	39

3.6.1.	Material.....	39
3.6.2.	Carga .....	39
3.6.3.	Modelo de liberación en el medio.....	39
3.6.4.	Espectroscopia de absorción ultravioleta-visible (UV).....	40
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS I DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
4.1.	Hidrogel PEA-4F4:PEGDA.....	42
4.2.	Matriz de fibras.....	43
4.2.1.	Fibras de PEA-8L6.....	43
4.2.2.	Fibras de PEA-8L6:BIO.....	44
4.3.	Matriz porosa PEA-8L6:BIO mediante <i>salt-leaching</i> .....	46
4.4.	Caracterización físico-química.....	47
4.4.1.	Hidrogel PEA-4F4:PEG-DA.....	47
4.4.2.	Fibras de PEA-8L6:BIO.....	54
4.4.3.	Matriz porosa PEA-8L6:BIO mediante <i>salt-leaching</i> .....	55
4.4.4.	Estudio propiedades térmicas PEA-8L6 y BIO .....	56
4.5.	Análisis morfológico.....	59
4.5.1.	Hidrogel PEA-4F4:PEG-DA.....	59
4.5.2.	Fibras de PEA-8L6:BIO.....	62
4.5.3.	Matriz porosa PEA-8L6:BIO mediante <i>salt-leaching</i> .....	64
4.6.	Estudio de las matrices cargadas con curcumina .....	65
4.6.1.	Análisis morfológico.....	67
4.6.2.	Estudio de liberación.....	71
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>77</b>
<b>5.</b>	<b>ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL .....</b>	<b>78</b>
<b>6.</b>	<b>EVALUACIÓN ECONÓMICA DEL PROYECTO .....</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>87</b>



# 1. Introducción

Es un hecho, que el planeta está cada vez más contaminado, como consecuencia de la emisión de gases contaminantes a la atmósfera, que producen el efecto invernadero y, en gran parte, por el desecho de plásticos no degradables y tóxicos para el medioambiente. Por este motivo, actualmente, un gran número de científicos enfocan su interés en el hallazgo y estudio de nuevos materiales poliméricos que no causen daño a nivel medioambiental.

Este es el caso de la ciencia de biomateriales, que basa sus estudios en la investigación de biomateriales, que son un grupo de productos diseñados para estar en contacto con sistemas biológicos en diversas aplicaciones médicas. Entre ellos, se encuentran todos los polímeros que se utilizan en biomedicina, para su uso en suturas, ingeniería de tejidos, sistemas de liberación controlada de fármacos ... Estos se diferencian según el tiempo de funcionalidad del material en la aplicación en cuestión. Existen aquellos utilizados para sustituir parcial o totalmente algún tejido del cuerpo, que no deben descomponerse a lo largo del tiempo, y por otro lado los polímeros biodegradables, que tienen que realizar una función durante un determinado periodo y luego degradarse en el organismo sin afectar al correcto funcionamiento del mismo.

## 1.1. Polímeros

Los polímeros son macromoléculas de alto peso molecular, que se forman por la unión de unidades repetitivas de menor peso, llamadas monómeros, a través de enlaces covalentes. Existen un número incontable de estos materiales utilizados en una gran diversidad de aplicaciones. Por esta razón, pueden clasificarse de muchas maneras: en función de sus propiedades térmicas, de su estructura, de su origen, ...

Considerando el comportamiento del material frente al calor, se encuentran los termoplásticos, aquellos polímeros lineales que al aplicarles calor son deformables y se derriten, frente a los termoestables, que, por el contrario, presentan una estructura entrecruzada que les proporciona una alta estabilidad térmica ya que, al calentarse el material, la red tridimensional formada por la unión covalente y entrelazada de las cadenas simplemente se compacta más haciendo el polímero más resistente.

En función de su estructura también se diferencian dos grupos, los polímeros amorfos, en los cuáles la disposición de las cadenas no sigue ningún orden y los semicristalinos, que son aquellos que poseen una parte de la red que sigue un determinado orden tridimensional. A la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) las cadenas de la parte amorfa del polímero adquieren movilidad, perdiendo densidad, dureza y rigidez y como consecuencia éste se vuelve elástico y es capaz de deformarse sin llegar a

rotura. La temperatura de fusión ( $T_f$ ) es a la cual la parte cristalina del polímero pasa de estado sólido a estado líquido [1]. En cuanto a su estructura química, existen los copolímeros, que son aquellas macromoléculas que tienen presente en su estructura varios tipos de monómeros, junto con los homopolímeros, que son los constituidos por una unidad repetitiva de una clase de monómero.

La mayoría de polímeros son obtenidos gracias a reacciones de polimerización, entre las cuáles se encuentran las reacciones por apertura del anillo (ROP), ampliamente utilizadas en siglo XXI en el sector químico para la obtención de un gran número de poliésteres, poliamidas o poliesteramidas, en las que el reactivo principal es un monómero cíclico susceptible a ataques por parte de aniones o cationes, que actúan como iniciadores o catalizadores, para conseguir la apertura del anillo. Las principales ventajas es que se requieren de unas condiciones de reacción leves, tienen un tiempo de reacción más corto y no se forman subproductos de la reacción [2]. En la Figura 1.1-1 se muestra un típico ejemplo de una reacción de este estilo.

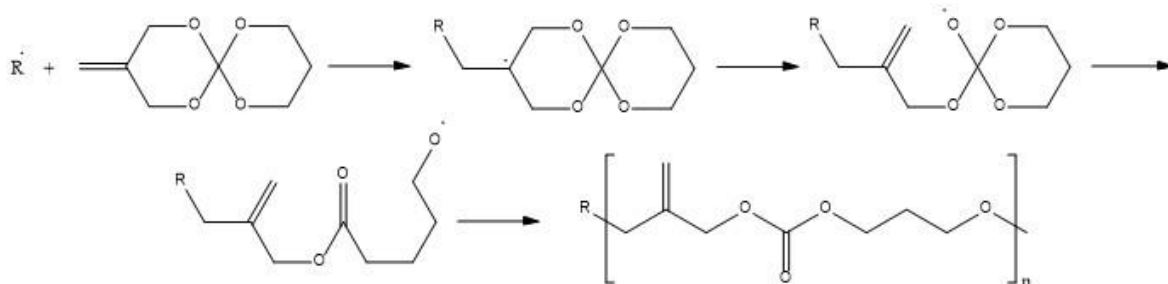


Figura 1.1-1. Reacción de apertura de anillo de un espiro carbonato

Otro método para sintetizar polímeros es la policondensación, que engloba el conjunto de uniones sucesivas de los monómeros que se llevan a cabo para obtener el polímero final, en las cuáles se obtienen moléculas de bajo peso molecular como  $H_2O$ ,  $HCl$ , ... Normalmente, son utilizadas para las reacciones de dioles con ácidos dicarboxílicos. Dentro de este grupo se encuentran varios métodos [3]:

- Policondensación en estado fundido: Es un método que se lleva a cabo en dos fases. La primera parte se realiza con condiciones más leves y se obtiene un prepolímero y, posteriormente, se aumenta la temperatura de reacción para favorecer la eliminación de productos de condensación. Las altas temperaturas requeridas en esta segunda fase limitan el peso molecular del producto final, pese a ello, es una técnica muy utilizada a nivel industrial debido a que no se requiere un tratamiento de lavado posterior a la reacción de polimerización.
- Polimerización interfacial: Se realiza al hacer reaccionar un diácido cloruro soluble en un solvente orgánico con una diamina o diol. Se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, corrigiendo así los problemas que produce las altas temperaturas del método anterior. En la Figura 1.1-2 se muestra un ejemplo del esquema a seguir para llevar a cabo esta policondensación.

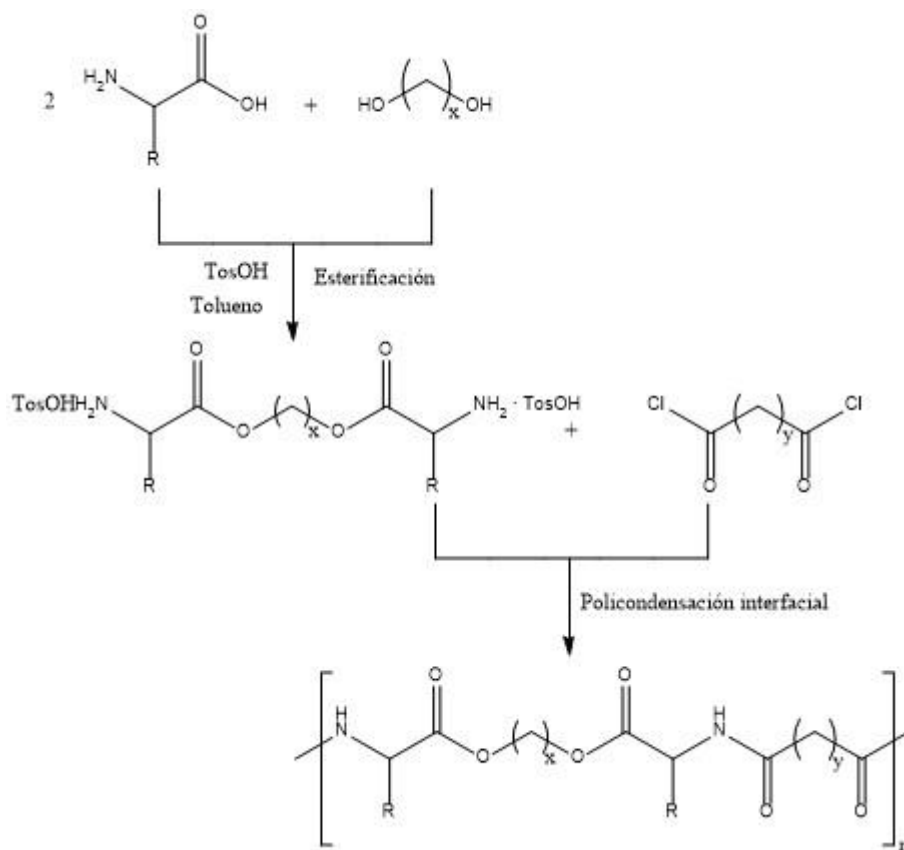


Figura 1.1-2. Policondensación interfacial de una amina con un diol y un ácido dicloruro

- Reacciones de policondensación en solución: Son aquellas que utilizan grupos de activación del ácido carboxílico, dejando grupos libres para formar nuevos ésteres o derivados, como para facilitar las reacciones de amilosis, en las cuáles reacciona un compuesto con una molécula de amoníaco o amina y se divide en dos partes, con la consecuente adición del grupo amino en la cadena principal. Con este método se obtienen polímero de alto peso molecular y con un alto ratio de polimerización. Como se puede observar en la Figura 1.1-3, se utiliza el p-nitrofenol como agente activador del ácido carboxílico, que forma un nuevo éster para su posterior polimerización en solución.

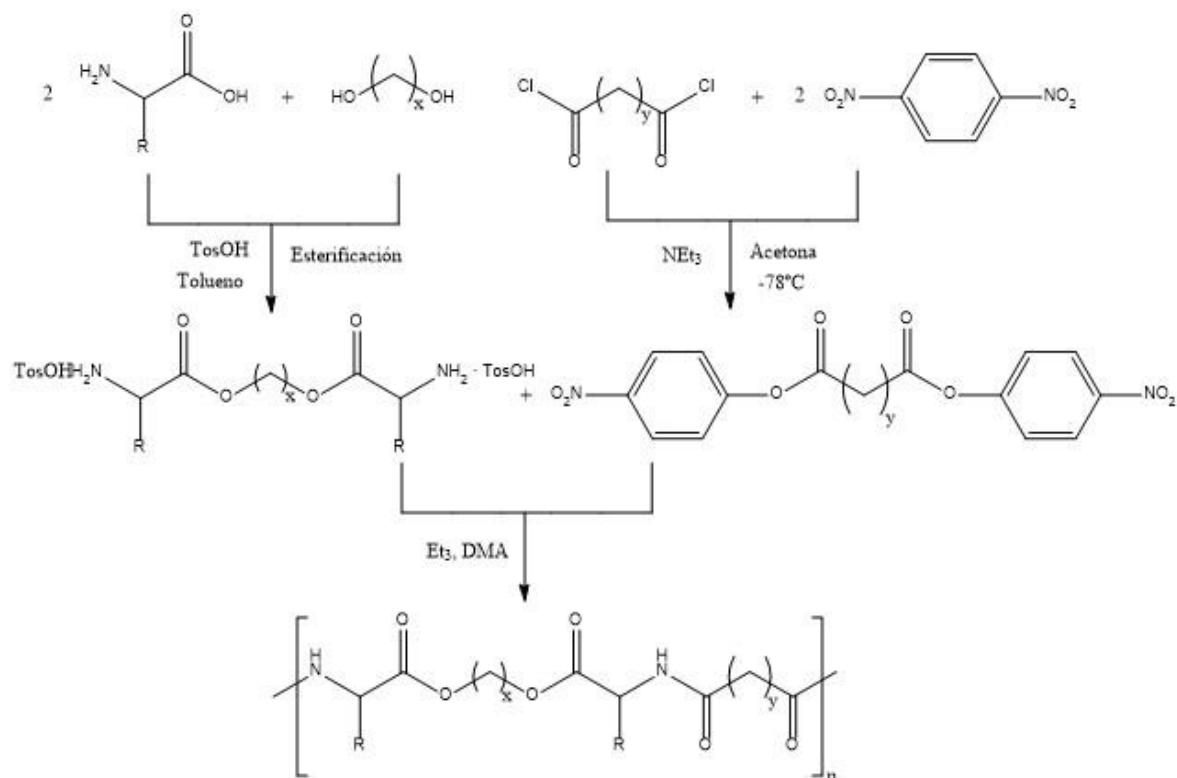


Figura 1.1-3. Policondensación de solución de una amina, con un diol y con un ácido dicarboxílico convertido en un éster de *p*-nitrofenol

- Policondensación de esta sólido/líquido: Dependiendo de la longitud de los polímeros, esta reacción puede llevarse a cabo en estado sólido, estado líquido o en las dos fases. Se basa en la eliminación del haluro metálico de uno de los monómeros como fuerza impulsora de la polimerización. Éste, se obtiene en forma de sal, que puede ser eliminada fácilmente por agua, dando como resultados materiales de un carácter poroso, aptos para una gran variedad de aplicaciones biomédicas. En la Figura 1.1-4 se puede observar un ejemplo de polimerización con formación de haluro metálico.

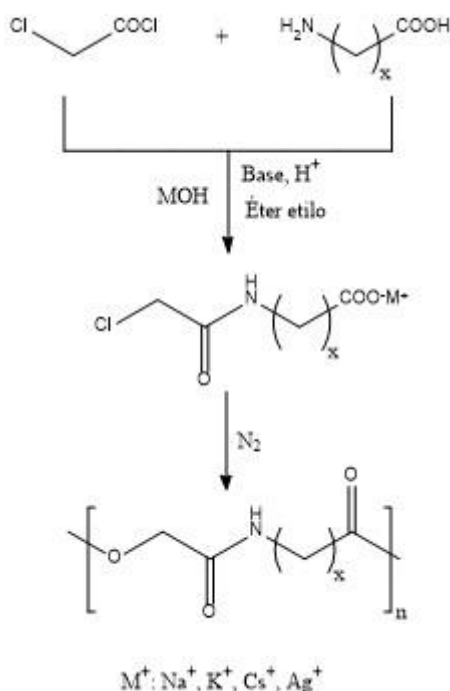


Figura 1.1-4. Esquema de síntesis de reacción para formar poliesteramidas con la formación de un haluro metálico de derivados de cloro acetato y  $\alpha$ -aminoácido

### 1.1.1. Polímeros biodegradables

Ampliando lo mencionado al inicio de la introducción, un polímero biodegradable es aquel que es capaz de degradarse gracias a la ayuda de agentes externos y descomponerse en subproductos naturales, que no son tóxicos para el medioambiente ni para el organismo como el agua, sales, gases, ... Se pueden clasificar en dos grandes grupos: los polímeros naturales y los sintéticos.

Los polímeros naturales son todos aquellos que provienen directamente de la naturaleza y, por lo tanto, no han sido sintetizados por científicos. Por lo general, estos compuestos son de difícil caracterización ya que contienen un gran número de moléculas complejas. Entre ellos se encuentran los ácidos nucleicos, las proteínas, el almidón, que es un material termoplástico con un carácter hidrofílico con una muy alta disponibilidad a nivel mundial [4] y la celulosa, que es el polímero natural más abundante de la tierra, ya que se encuentra en la pared de la mayoría de células vegetales [5]. Estos son utilizados desde hace años en biomedicina ya que se trata de compuestos tan importantes como el ADN humano, muchas de las proteínas necesarias para la vida, y muchos de ellos se modifican para poder ser utilizados en otras aplicaciones médicas como suturas o gasas estériles.

Por otro lado, el resto de polímeros que son creados en el laboratorio conforman los polímeros sintéticos. Dentro de este grupo se encuentran los poliésteres, las poliamidas, los poliuretanos, las poliesteramidas, ... Son ampliamente utilizados en biomedicina debido a que son moldeables y se pueden modificar para conseguir las características que uno desea.



En el presente trabajo se sintetiza una PEA y se estudia una mezcla de una PEA con un poliéster, por este motivo, a continuación, se cree conveniente explicar detenidamente estos dos grupos: Poliésteres y poliesteramidas. Este último es un grupo emergente de polímeros biodegradables en biomedicina, que suma el carácter hidrolizable de los ésteres junto con las propiedades mecánicas y térmicas de las amidas.

#### 1.1.1.1. Poliésteres

Los poliésteres son el grupo de polímeros biodegradables más utilizados en el ámbito de la biomedicina, debido a que son sintéticos, y eso conlleva que permiten su modificación para adquirir las propiedades deseadas, y a su fácil degradabilidad propiciada por la característica hidrolizable de los grupos ésteres ( $-\text{COO}-$ ) en la cadena. A continuación, se repasan los compuestos de este grupo más utilizados en medicina.

- Ácido poliláctido (PLA): Se obtiene a partir del ácido láctido y puede ser preparado por apertura del anillo o por policondensación. Posee un carbono asimétrico en su estructura y por eso se puede obtener isómeros con diferentes características. Es utilizado en la industria alimentaria, de la pintura, en la de plástico para producir envases, pero donde más es utilizado es en bioingeniería. A continuación, en la Figura 1.1-5 se muestra un esquema de las posibles reacciones de obtención de este compuesto.

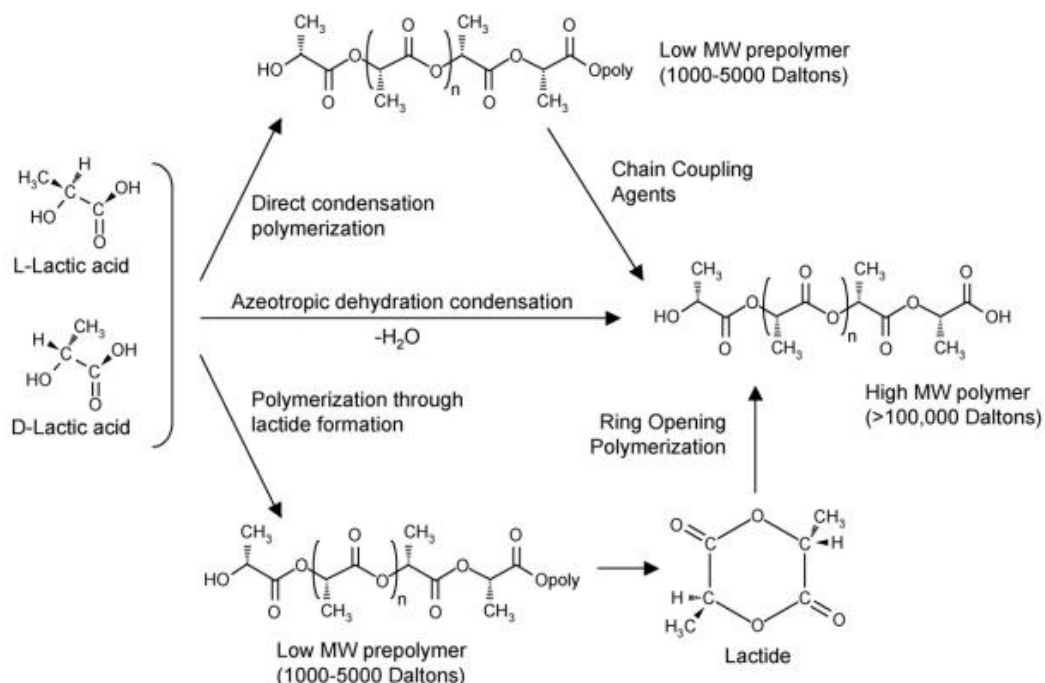


Figura 1.1-5. Posibles vías de obtención del ácido poliláctido [6]

- Ácido poliglicólico (PGA): Se obtiene a partir del ácido poliglicólico y también se puede obtener por policondensación o apertura del anillo, pese a que el primero no es un método muy aconsejable ya que se obtienen polímeros de bajo peso molecular. Es el poliéster alifático lineal más simple y puede ser convertido en agua y dióxido de carbono bajo ciertas condiciones[7]. La gran mayoría de aplicaciones están enfocadas a la biomedicina debido a su rápida degradación. En la Figura 1.1-6 se muestran las vías de obtención del polímero.

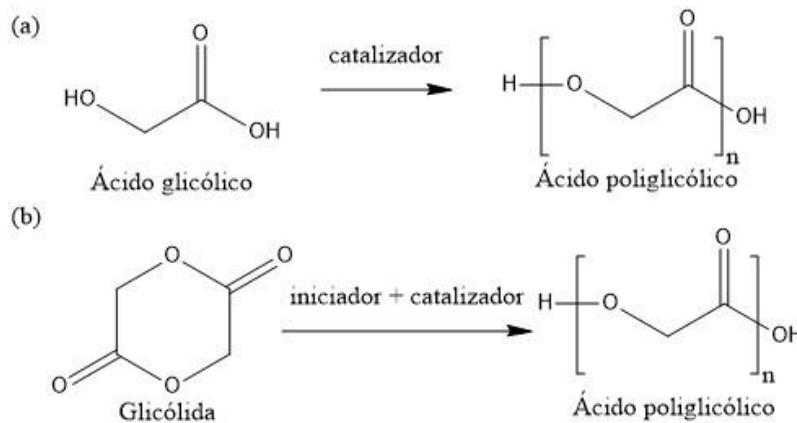


Figura 1.1-6. Vías de obtención del PGA: a) Policondensación de ácido glicólico b) Apertura del anillo [8]

- Policaprolactona (PCL): Se compone de unidades de ácido hexanoico ( $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2$ ). Es un polímero semicristalino que posee un punto de fusión bajo, lo que hace posible su fácil procesamiento. Fue uno de los primeros compuestos biodegradables investigados para su uso en medicina. Sus buenas propiedades mecánicas lo hacen apto para su utilización en ingeniería de tejidos como apósito para heridas, anticonceptivos o en odontología. En la Figura 1.1-7 se puede observar que este polímero se puede sintetizar por distintos métodos.

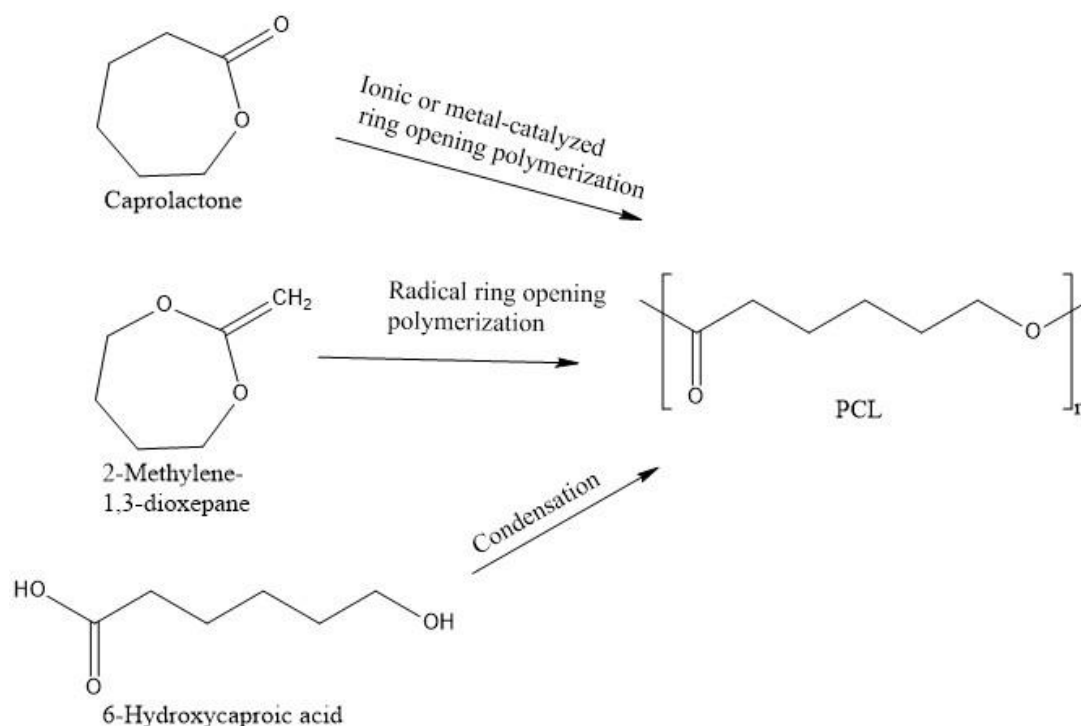


Figura 1.1-7. Esquema de las distintas vías de obtención del PCL [9]

A parte, se encuentra el grupo de los poliésteres alifáticos que provienen de reacciones de policondensación de dioles como el 1,4-butanodiol, con ácidos dicarboxílicos, como el succínico y el adípico [10]. Estos, han captado la atención del mundo de la biomedicina en los últimos años, des de su descubrimiento por *Showa High Polymer* bajo la marca de *Bionolle* [11]. Éste último, sintetizado a través de una reacción de policondensación del 1,4-Butanodiol y ácido succínico, es utilizado en el presente trabajo para mejorar las características térmicas de la poliesteramida PEA-8L6 y obtener un material más resistente a la temperatura. En la Figura 1.1-8 se muestra la estructura de este compuesto.

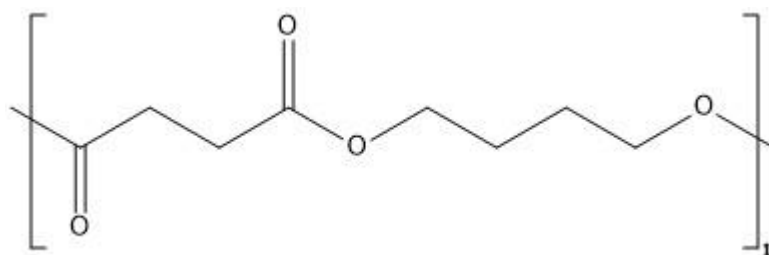


Figura 1.1-8. Estructura molecular del Bionolle

### 1.1.1.2. Poliesteramidas

Este grupo engloba todos los polímeros obtenidos por reacciones de condensación de enlaces éster con enlaces amida. De este modo, se consigue mejorar las características térmicas que tienen los poliésteres, manteniendo el carácter hidrolizable de estos. Las fuertes interacciones moleculares del enlace hidrogeno entre los grupos amida (-NHCO-) sumado a las buenas características de degradación que ofrecen los grupos ésteres (-COO-), hacen de estos polímeros la principal fuente de investigación de materiales para su uso en biomedicina. Se han llevado a cabo varios estudios para sintetizar poliesteramidas por apertura del anillo o por policondensación [12]. Dentro de este grupo se pueden diferenciar varias familias de compuestos:

- **Polidépsipeptidos:** Son copolímeros formados por  $\alpha$ -hidroxiácidos y  $\alpha$ -aminoácidos: Estos son principalmente preparados por apertura del anillo [13].
- **Poliesteramidas basadas en nylons y poliésteres comerciales:** Donde la principal fuente de investigación son copolímeros de nylon 6 y de caprolactona.
- **Poliesteramidas derivadas de carbohidratos:** Se ha estudiado polímeros derivados de la L-arabinosa, D-xilosa o ácido tartárico que presentan buenas características de degradación bacteriana e hidrolítica.
- **Poliesteramidas derivadas de  $\alpha$ -aminoácidos:** Se polimerizan por policondensación interfacial o en solución. Derivan de un diol y dos unidades del aminoácido.

En la primera parte de este trabajo se sintetiza la poliesteramida PEA-4F4, cuya estructura se puede observar en la Figura 1.1-9, para su posterior utilización como sistema de liberación controlada de fármacos. La síntesis se lleva a cabo por una policondensación interfacial en la que previamente se requiere sintetizar los monómeros.

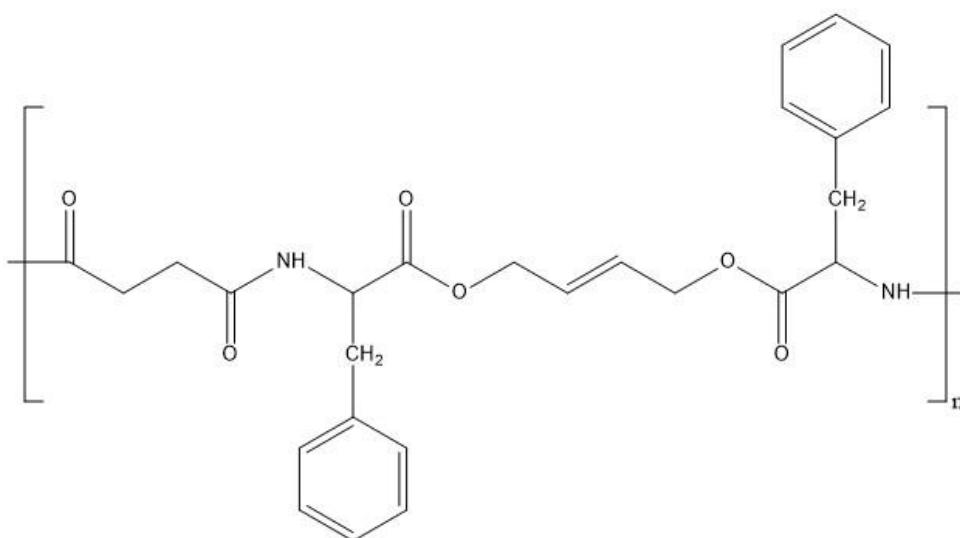


Figura 1.1-9. Estructura de la poliesteramida PEA-4F4

La poliesteramida (PEA) denominada PEA-4F4 es sintetizada a partir del cloruro de succinilo (4C), el aminoácido fenilalanina (F), y el cis-1,4-butendiol (4C).

Por otro lado, se trabajará para llevar a cabo unas fibras y una matriz porosa mediante *leaching*, cargadas con fármaco, constituidas en parte por la poliesteramida 8L6, la estructura de la cual se puede observar en la siguiente Figura 1.1-10. Este compuesto proviene de una reacción de policondensación del ácido sebácico con el amino ácido L-Leucina y el 1,6-Hexanodiol.

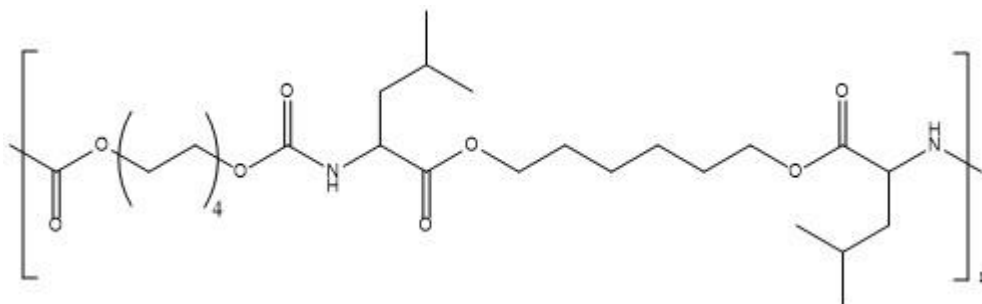


Figura 1.1-10. Estructura de la poliesteramida PEA-8L6

## 1.2. Aplicaciones biomédicas

Des de principis de siglo, los poliésteres y las poliesteramidas son dos de los grupos de materiales biodegradables más investigados para el uso en biomedicina. La capacidad de modificación de las características de estos polímeros para que sean capaces de llevar a cabo diversas funciones y, sobre todo, la fácil degradabilidad ante organismos o por hidrólisis, hace que estos compuestos sean utilizados en ámbitos diferentes de la biomedicina. Pueden ser utilizados como suturas, sistemas de liberación controlada de fármacos, micro dispositivos cardiovasculares, en ingeniería de tejidos como *estructuras porosas*.

Para el diseño de materiales biodegradables y biocompatibles aptos para el uso en biomedicina, hay que considerar varias propiedades [14]:

- El material no puede provocar ninguna respuesta inflamatoria en el organismo que se utiliza.
- Debe poseer un tiempo de degradación que coincida con el tiempo de recuperación o regeneración.
- Tiene que poseer las propiedades mecánicas apropiadas para el uso que se la va a dar.
- El material tiene que producir productos de degradación que no sean tóxicos para el organismo y que sean fácilmente absorbidos o expulsados.
- Tienen que poseer la permeabilidad y procesabilidad adecuadas para la aplicación que se le pretende dar.

Dependiendo de la utilidad que se le vaya a dar, el material se puede presentar en estructuras muy distintas. Este trabajo enfoca su investigación en realizar matrices porosas aptas para ser utilizadas como sistemas de liberación de fármacos. A continuación, se explica brevemente cada una de las matrices realizadas:

- Hidrogel: Es un material que ha sido considerablemente estudiado en los últimos 50 años, debido al gran abanico de aplicaciones en el que se puede utilizar [15]. Está constituido por una red polimérica entrecruzada. Este es capaz de hincharse con agua y absorber grandes cantidades de esta manteniendo las moléculas dentro de su red tridimensional. Esta capacidad viene dada por los grupos funcionales hidrofílicos que posee en su estructura y, los enlaces cruzados entre las cadenas de su estructura, proporcionan al material una alta resistencia a la disolución. Pueden ser obtenidos mediante fotolitografía, a través de moldes de réplica, con ensamblaje de estructura directa, vía una bioimpresora 3D o por una polimerización de emulsión [16].
- Nanofibras: Se definen como estructuras alargadas y lisas de un diámetro comprendido entre 50 y 300 nm. La baja densidad y el elevado volumen de poros que presentan, hacen a estos materiales muy interesantes para su uso en biomedicina como sistemas de liberación controlada de fármacos. Se pueden obtener mediante varios métodos [17]. En este trabajo se preparan nanofibras mediante electrospinning, técnica que se explica más adelante.
- Placas porosas mediante *salt-leaching*: Son estructuras de biomateriales sólidas y porosas, creadas mediante una solución polimérica solidificada que contiene sal, que luego se retira haciendo pasar agua, dejando en el material poros que pueden ser invadidos por células[18]. Están diseñados para realizar las siguientes funciones[19].
  1. Promover la interacción del material con las células.
  2. Permitir el transporte de gases, nutrientes y los factores necesarios para la supervivencia de las células, la proliferación y la diferenciación.
  3. Biodegradables a una ratio controlable que se aproxime al tiempo de regeneración del tejido.
  4. No provocar inflamación o toxicidad en el organismo al cual se incorpora.

### 1.2.1. Liberación de fármaco controlada

Los sistemas de liberación controlada de fármacos son materiales poliméricos o dispositivos que ayudan a la liberación controlada de un agente terapéutico en el organismo. El hecho de que el método empleado para liberar un fármaco en el organismo tiene un efecto significativo en la eficacia del mismo y, el lento progreso en el tratamiento de algunas enfermedades, son los principales motivos por los que en los últimos años ha surgido una demanda en el estudio de nuevos sistemas de liberación. Estos sistemas son capaces de prevenir la degradación y la pérdida del medicamento antes de realizar su

función, aumentar la biocompatibilidad del organismo con el fármaco, controlar la fracción del mismo acumulada en la zona requerida, dosificar la droga en un lugar específico, disminuir la toxicidad que pueden generar algunos fármacos, y reducir el número de dosis del medicamento.

Estos sistemas pueden estar conformados por polímeros, microcápsulas, células, liposomas o lipoproteínas y, se clasifican según su objetivo, es decir, si se quiere controlar la velocidad de liberación o el lugar [20]. A continuación, en la Figura 1.2-1 se muestra la clasificación de los distintos sistemas de liberación.

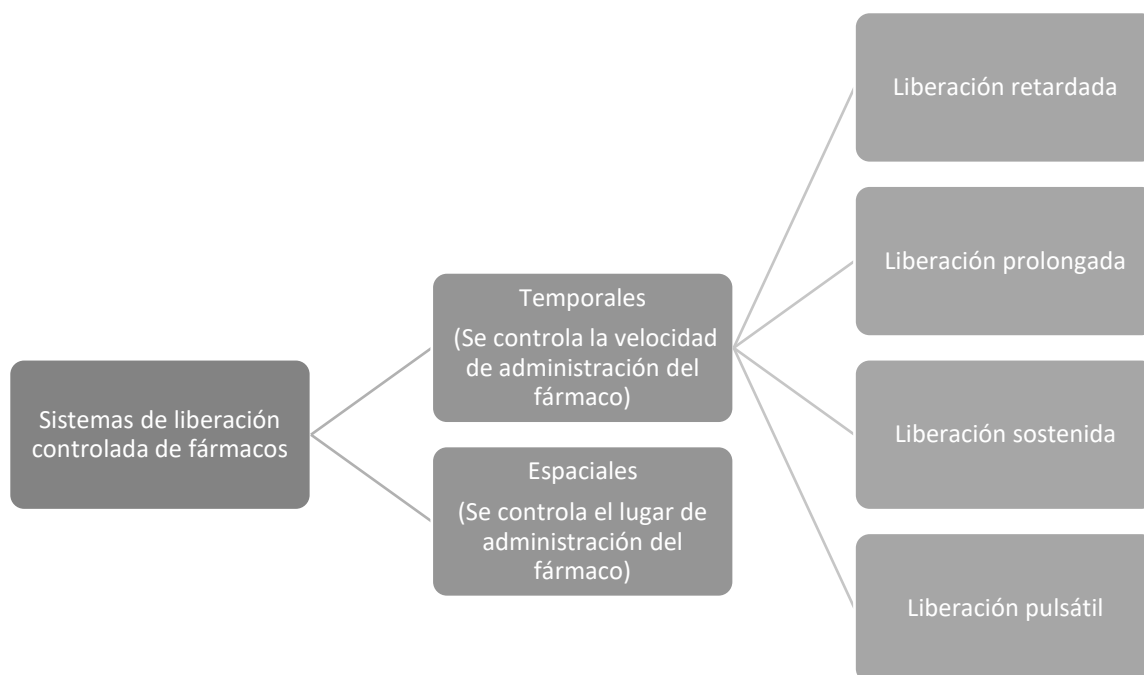


Figura 1.2-1. Clasificación de los tipos de sistemas de liberación

Dentro de aquellos en los que se controla la velocidad de liberación se distinguen varios tipos[21]:

- Liberación retardada: La liberación del fármaco se libera en un momento distinto al de la administración, pero sin prolongar el efecto terapéutico.
- Liberación prolongada: El fármaco se libera inicialmente en una proporción suficiente para producir efecto terapéutico y posteriormente lo hace más lentamente, con lo que se consigue alargar el efecto.
- Liberación sostenida: Son aquellos sistemas en los que el agente se libera a velocidad constante.
- Liberación pulsátil: La liberación se produce en distintas fases.

Por otro lado, se encuentran los sistemas en los que se pretende controlar el lugar de administración del fármaco, que están formados por un transportador y una sustancia activa. Este transportador es

capaz de reconocer una molécula y ejercer la acción de liberar. En la última década se ha estudiado el uso de hidrogeles con aptámeros[22], que son ácidos nucleicos de cadena sencilla de ADN o ARN, cuya estructura tridimensional les permite reconocer y unirse con afinidad a una molécula determinada. La unión del aptámero con la molécula produce cambios estructuras en el hidrogel, que se disocia y libera el fármaco en el lugar deseado.

En este trabajo se estudia la capacidad de distintas matrices porosas a liberar curcumina. Para ello se tienen que cargar las diferentes estructuras realizadas con distintas cantidades de fármaco y se estudia la velocidad de liberación en un medio determinado.

#### 1.2.1.1. Curcumina

La curcumina es el fármaco escogido para realizar el estudio de liberación. Ésta proviene de la cúrcuma, y ofrece un amplio rango de funciones biológicas, como antioxidante[23] o antiinflamatorio [24] y también está siendo estudiada como agente anti cancerígeno[25]. En la Figura 1.2-2 se muestra la estructura molecular del compuesto.

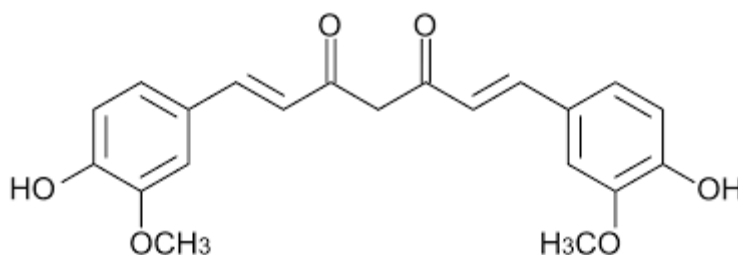


Figura 1.2-2. Estructura química de la curcumina

A pesar del gran potencial para el tratamiento de enfermedades, este fármaco no ha sido utilizado en medicina demasiado debido a que presenta una baja biodegradabilidad y una baja solubilidad en agua. Por este motivo, actualmente, se están investigando nuevas vías para transportar la curcumina a la zona afectada del organismo como hidrogeles, nanofibras, nanopartículas, ... Mediante un proceso de adsorción, estos materiales retienen el compuesto en sus estructuras y al sumergirlos en un medio lo van liberando gradualmente.

En el presente trabajo, el fármaco se añade en las diferentes estructuras que se obtienen, en diferentes composiciones y se estudia la liberación en un medio de PBS-EtOH al 70% de EtOH. Esta liberación se controla mediante la técnica de espectroscopia UV-Vis y, en base a estudios anteriores, el espectro de las muestras debe presentar un pico a 430 nm<sup>-1</sup>[26].



## 2. Objetivos del trabajo

El objetivo principal de este proyecto de Fin de Grado fue estudiar tres matrices porosas preparadas con polímeros biodegradables: un hidrogel, una matriz de fibras y una matriz porosa obtenida mediante la técnica de salt-leaching. Adicionalmente, las matrices porosas fueron cargadas con la droga antitumoral curcumina para posteriormente estudiar la liberación del fármaco desde las diferentes matrices. Actualmente, estos sistemas de liberación controlada de fármacos son de gran interés en el sector de la biomedicina debido a que liberando de forma controlada un fármaco en una zona afectada se podrían evitar diversos problemas asociados al implante de estos biomateriales; p.e., rechazo por inflamación, infección microbiana, etc. Finalmente, remarcar que el desarrollo de nuevos materiales con mayor biodegradabilidad y versatilidad en su conformado son temas de actualidad en el campo biomédico.

### 2.1. Objetivos específicos

- Sintetizar un hidrogel constituido por los polímeros PEA-4F4 y PEG-DA (poliéster amida y entrecruzante, respectivamente) con una proporción másica de 1:4 y otro con una proporción de 1:2, para estudiar el efecto del exceso de PEG-DA en la morfología del hidrogel. Los hidrogeles serán caracterizados por microscopía electrónica de barrido (SEM), y los polímeros y sus precursores serán caracterizados mediante:
  - Espectroscopia infrarroja (FT-IR)
  - Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)
- Elaborar nanofibras de PEA-8L6 mediante la técnica de *electrospinning*. El proceso de elaboración de estas fibras será optimizado evaluando las electrofibras mediante microscopía óptica.
- Elaborar una matriz de fibras con mejores propiedades térmicas añadiendo el poliéster *Bionolle (BIO)*, para obtener fibras de PEA-8L6:BIO 50:50 wt%. Se escoge este polímero debido a la buena estabilidad térmica que presenta y ya que es uno de los poliésteres más comercializados. Las propiedades térmicas serán estudiadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- Estandarizar las condiciones operacionales del *electrospinning* para obtener fibras de PEA-8L6:BIO en buenas condiciones. El proceso de elaboración de estas fibras será seguido mediante microscopía óptica y estas nuevas fibras serán caracterizadas morfológicamente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

- Elaborar placas porosas de PEA-8L6: BIO (25:25 wt%) mediante el uso de la técnica de *salt-leaching*, donde se resuspende partículas de NaCl al 50 wt%, que serán caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Cargar las matrices porosas finales con curcumina y estudiar los cambios que provoca en la morfología la adición del fármaco.
- Estudiar la liberación de curcumina en las diferentes matrices. El objetivo principal en este paso es cuantificar la liberación y la carga del fármaco en los diferentes materiales en un medio de PBS-Etanol al 70% de EtOH en volumen.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Hidrogel de PEA-4F4:PEG-DA

#### 3.1.1. Material

Para obtener el polímero PEA-4F4 se utiliza Tolueno (Toluene Anhydrous 99,8%, Sigma-Aldrich), ácido p-toluensulfónico (p-toluensulfonic acid monohydrate, Sigma-Aldrich), Butendiol (cis-Buten- 1'4-diol, Sigma-Aldrich), L-fenilalanina (L-phenylalanine, Sigma-Aldrich), cloruro de succinilo (succinyl chloride, Sigma-Aldrich), diclorometano (Dichloromethane, Sigma-Aldrich), DMSO (Dimethyl Sulfoxide for Analysis, EMSURE), Butanol (1-Butanol, Fisher-Chemical), Carbonato sódico (Sodio carbonato anhidro, Panreac) y Etanol (Ethanol, Honeywell Research Chemicals).

En la elaboración del polímero PEG-DA, se utiliza PEG (Poly(ethylene glycol) 10000, Fluka), Tolueno (Toluene, Sigma-Aldrich), trietilamina (Triethylamine, Sigma-Aldrich), cloruro de acrilóilo (Acryloyl chloride, Sigma-Aldrich) y Hexano (n-hexane, Sigma-Aldrich).

Finalmente, para la realización del hidrogel se emplean los polímeros PEA-4F4 y PEG-DA obtenidos, DMA (n,n-Dimethylacetamide, Sigma-Aldrich) y Igracur (2-Hydroxy-4'-2(-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone, Sigma-Aldrich).

#### 3.1.2. Poliesteramida PEA-4F4

Este polímero se forma mediante una polimerización interfacial, haciendo reaccionar un mol de una sal del ácido di-p-toluensulfónico del éster de Fenilalanina, que se forma a través de una reacción de condensación, con un mol de cloruro de succínico. A continuación, en la Figura 3.1-1, se muestra un esquema de las reacciones seguidas para la obtención del compuesto.

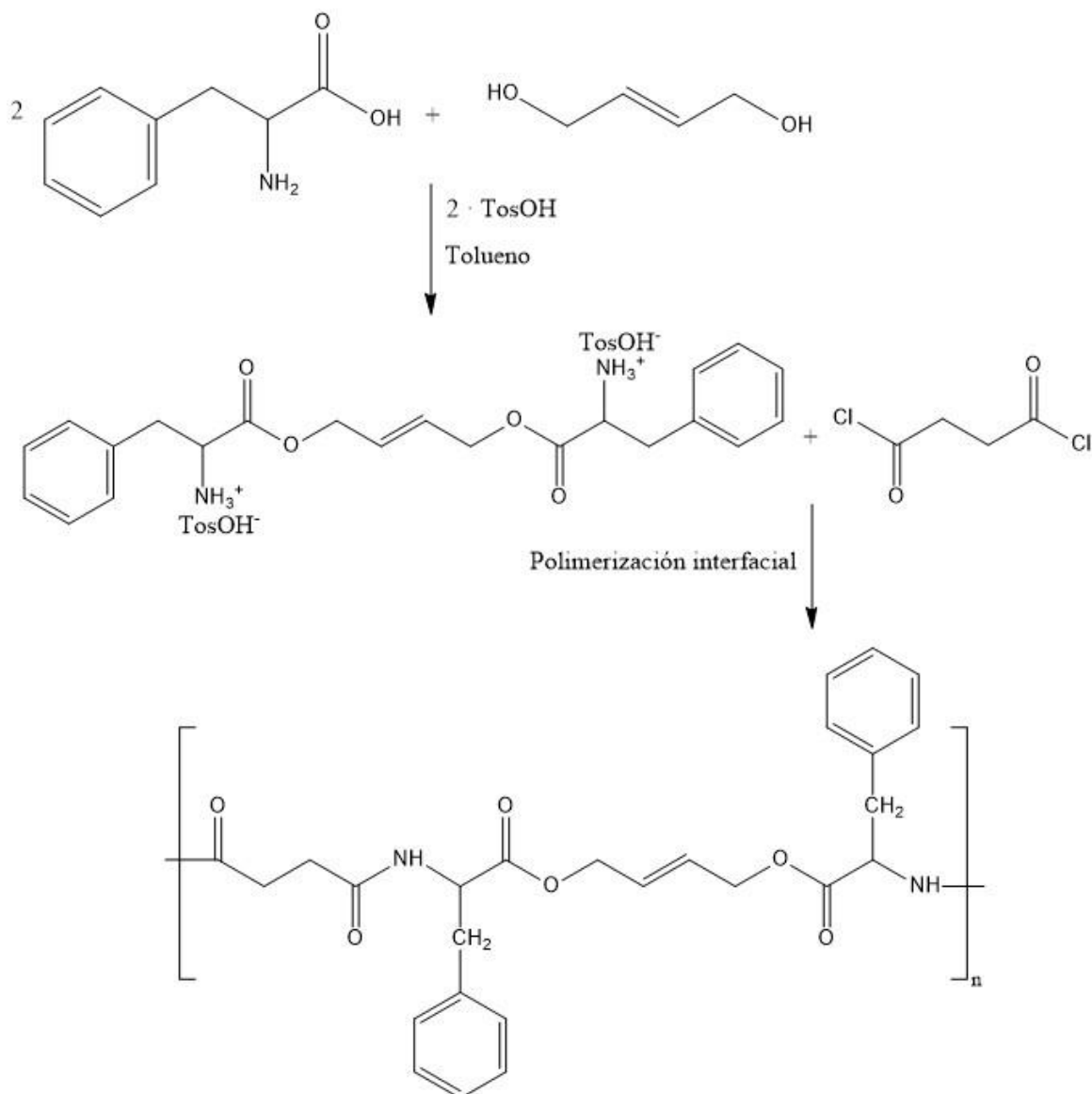


Figura 3.1-1. Esquema de las reacciones a seguir para la formación del polímero PEA-4F4

### 3.1.2.1. Síntesis de la sal del ácido di-*p*-toluensulfónico del éster de Fenilalanina

La síntesis de la sal del ácido di-*p*-toluensulfónico del éster de Fenilalanina es una reacción de condensación, y, por cada mol de ácido di-*p*-toluensulfónico se formará un mol de agua. Está basada en trabajos realizados anteriormente[27][28], y el proceso que se ha seguido se explica a continuación.

1. En un balón se mezclan 0,132 moles de Fenilalanina, 0,135 moles de ácido *p*-toluensulfónico y 0,066 moles de *cis*-1,4-butendiol con 250 mL de Tolueno que actúa como medio de reacción. Como se observa en la Figura 3.1-2, se monta en un agitador y se equipa con un aparato Dean-Stark, lleno de Tolueno, que atraparé el agua obtenida por condensación. Se calienta hasta

una temperatura de 140°C y se deja en agitación durante 24 h para acabar obteniendo 3 mL de agua como producto de la reacción.

2. Se obtiene un sólido que después de enfriarlo a temperatura ambiente, se filtra.
3. El producto obtenido se purifica mediante recristalización, disolviéndolo en DMSO y precipitándolo con Butanol tres veces.
4. El producto final en un sólido blanco que se deja secando al vacío durante 24 horas.

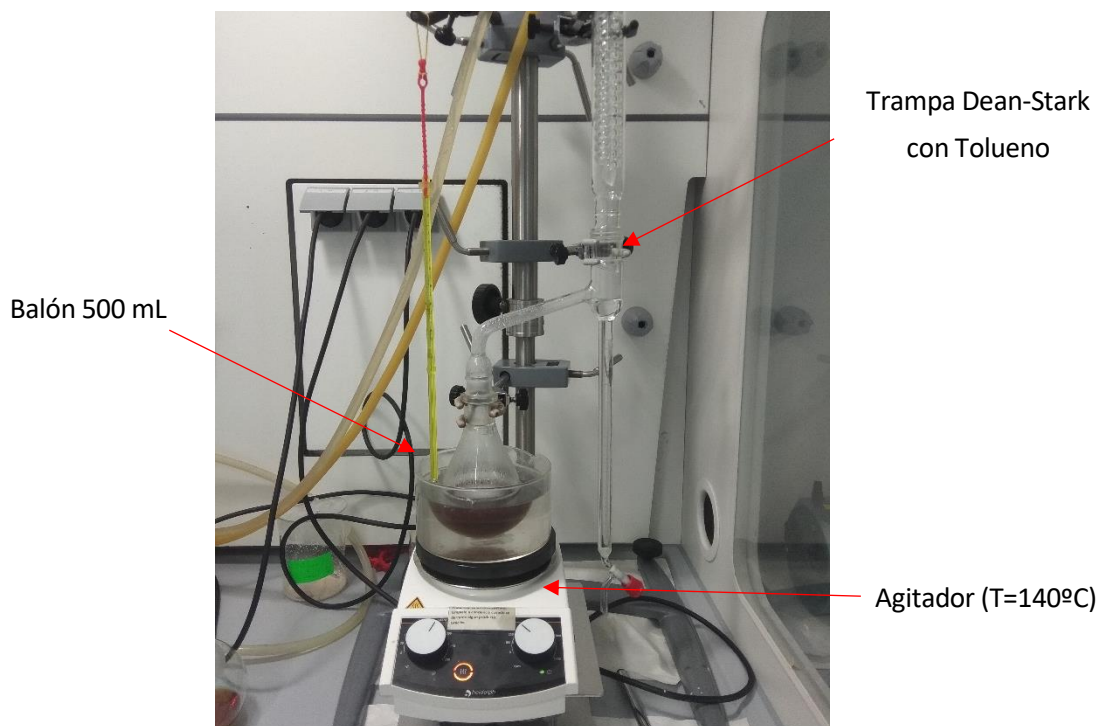


Figura 3.1-2. Montaje realizado para la obtención del éster

### 3.1.2.2. Polimerización interfacial PEA-4F4

Para obtener la PEA-4F4, se ha llevado a cabo una polimerización interfacial entre la sal del ácido di-*p*-toluensulfónico previamente realizada, con el cloruro de succínico. Esta polimerización está basada en estudios previos que trabajan en el mismo compuesto[29] y el método realizado se explica a continuación.

1. En un vaso de precipitados se prepara una solución de 22,5 mL de agua con 15 mmol de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .
2. Una vez disuelto, se añaden 7,5 mmol de la sal del ácido di-*p*-toluensulfónico del éster de fenilalanina y se agita hasta su completa disolución.
3. En un vaso de precipitados aparte, se mezclan 7,5 mmol de cloruro de succinilo y 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se deja en agitación.

4. Como se observa en la Figura 3.1-3, con un decantador se gotea gota a gota la solución básica de la sal sobre el cloruro, que está en agitación. Durante el transcurso de esta reacción se tiene que observar la formación del polímero en estado sólido.
5. Una vez finalizada, se mantiene la agitación durante 30 minutos.
6. El sólido que se obtiene se limpia con Etanol, Agua, Etanol y Diclorometano para acabar obteniendo un polvo blanco.

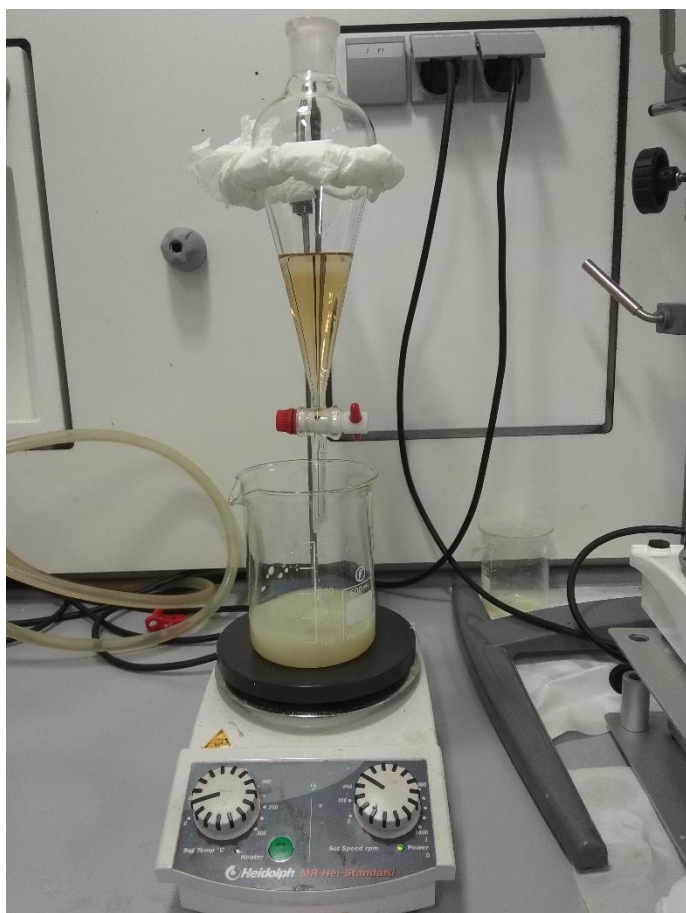


Figura 3.1-3. Montaje utilizado para la polimerización interfacial

### 3.1.3. Polímero PEG-DA

Para la formación del hidrogel, es necesario un polímero que actúe como agente entrecruzante de las cadenas principales, y por este motivo, se requiere la síntesis previa del PEG-DA. Ésta ha llevado a cabo mediante un procedimiento basado en un método experimental previamente publicado[30]. A continuación, se explica el método realizado para su obtención.

1. En un matraz de tres bocas se disuelven 1,2 mmol de PEG en 150 mL de Tolueno, y, en constante agitación se aumenta la temperatura hasta 45 °C, sumergiéndolo en un baño de silicona, hasta disolverlo completamente.

- Una vez disuelto, se enfría la solución a temperatura ambiente, manteniendo la agitación y se añade 12 mmol de trietilamina.
- Se añaden 12 mmol de cloruro de acrilóilo mediante goteo y se añade nitrógeno por una boca, mientras la otra se mantiene abierta, para conseguir una atmósfera sin oxígeno.
- Una vez conseguido, se tapan todas las bocas del matraz y se calienta la solución hasta una temperatura de 80°C y se mantiene en agitación durante 2 horas y 30 minutos.
- El producto obtenido se filtra para eliminar la fase sólida, que corresponde a sales de trietilamina formadas durante la reacción.
- La fase líquida, correspondiente al PEG-DA, se precipita mediante goteo en 700 mL de n-hexano.
- El sólido final, se filtra y se almacena en un desecador de vacío a temperatura ambiente.

### 3.1.4. Síntesis y carga hidrogel PEA-4F4:PEG-DA

Los hidrogeles se preparan siguiendo un procedimiento realizado anteriormente[30]. Se sintetizan mediante fotopolimerización de PEA-4F4 y PEG-DA, con una pequeña cantidad de *Igracur*, que se utiliza como fotoiniciador en una solución de DMA. En la Figura 3.1-4 se muestra un esquema de los pasos a realizar para la obtención del hidrogel y en la Figura 3.1-5 se puede observar cómo sería un posible entrecruzamiento entre los dos polímeros.



Figura 3.1-4. Preparación del hidrogel

A continuación, se explica el método seguido para la obtención del hidrogel.

- Se pesan los moles de de PEA-4F4 y de PEG-DA correspondientes y se añaden a un vaso de 25 mL y se disuelven en DMA.
- Una vez disueltos, se añaden 0,032 g de *Igracur* y se agita hasta la completa disolución a temperatura ambiente.
- La solución se traspasa a un vial y se irradia con una lámpara de UV (365 nm, 16W) durante 12 horas.
- Transcurrido este tiempo, si se observa que el hidrogel aún no se ha formado se deja la lámpara encendida hasta la completa reticulación.

5. El hidrogel resultante, se sumerge en agua durante 48 horas para conseguir liberar todo el PEG-DA que no ha reaccionado. Cada 6 horas se cambia el agua para evitar que esta se sature.
6. Una vez limpio, se seca superficialmente el hidrogel con un papel y se pesa, para obtener el peso en húmedo ( $W_s$ ).
7. Se congela con nitrógeno líquido para llevarlo al liofilizador, y de esta forma secarlo.
8. El hidrogel en seco, se vuelve a pesar, para obtener el peso en seco ( $W_d$ ). Con estos datos y la ecuación 1 se obtiene el ratio de hinchamiento del material ( $Q$ ).

$$Q = \frac{W_s - W_d}{W_d} \cdot 100\% \quad (1)$$

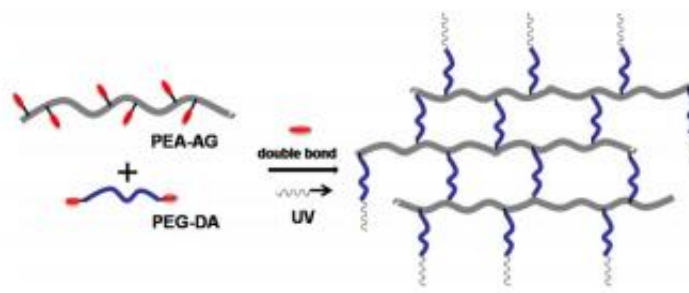


Figura 3.1-5. Posible entrecruzamiento de una poliésteramida con PEG-DA [31]

## 3.2. Matriz de fibras

### 3.2.1. Material

Para obtener la solución polimérica que será utilizada para la técnica de *electrospinning* se ha empleado Cloroformo (Chloroform sabilized with amylene, Scharlau) como disolvente, y los polímeros 8L6 y Bionolle (polibutilen succinato) previamente sintetizados por el laboratorio.

### 3.2.2. Electrospinning

Durante los últimos años, la técnica de *electrospinning* ha sido ampliamente estudiada en biomedicina, porque ofrece la posibilidad de crear fibras a escala micro y nanométrica que pueden ser útiles en múltiples aplicaciones[32], y por el amplio grupo de polímeros que se pueden utilizar con este método. Estos rangos de la escala manométrica permiten obtener materiales con un área superficial muy grande en relación al volumen, con flexibilidad en la superficie, una alta porosidad controlable e interconectada y un alto rendimiento mecánico.

En la Figura 3.2-2, se muestra el montaje utilizado para realizar esta técnica. A través de una aguja metálica, que está montada en una jeringa, se expulsa una solución polimérica mediante un flujo



controlado. Cuando se aplica un voltaje alto sobre la muestra, la gota que sale de la aguja se electrifica y las cargas se mantienen en la superficie, de modo que esta experimenta dos fuerzas: la repulsión entre las cargas superficiales y la fuerza que ejerce el campo magnético externo. Al soportar el efecto de estas fuerzas, la gota, progresivamente, se alarga y forma un cono inverso, como el de la Figura 3.2-1. Llega un punto en el que la concentración de carga es tan elevada que sobre pasa la tensión superficial y se crea una corriente electrificada, que, atraída por el colector, recorre una trayectoria inestable hasta depositarse en él. A parte del equipo de electrospinning es importante el uso de guantes, papel de aluminio, cubreobjetos, portaobjetos y también se utiliza un microscopio óptico para analizar las fibras in-situ y mejorar las condiciones de electrohilado en caso necesario.

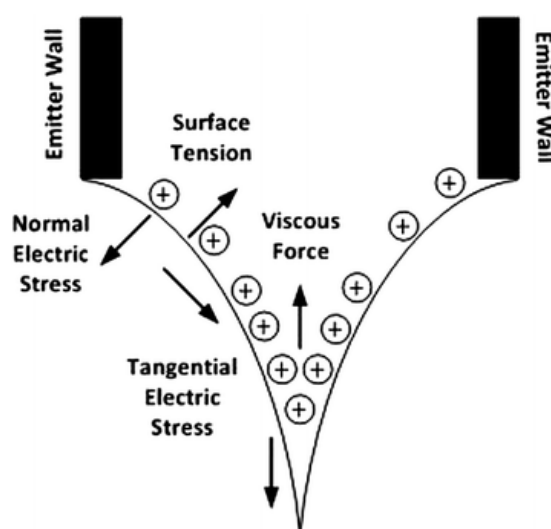


Figura 3.2-1. Cono inverso o cono de Taylor que se forma al aplicar voltaje a la gota

El procedimiento seguido para desarrollar las fibras en *electrospinning* ha sido el siguiente:

1. Para realizar la solución polimérica, se añaden las concentraciones de polímero y  $\text{CHCl}_3$  a un vial y se introducen en una cámara incubadora con gestor orbital de OVAN a  $37^\circ\text{C}$  con agitación a 100 rpm para su disolución.
2. Transcurridas 24 horas, se carga una jeringa *Bed-Dickinson* de 5 mL con la solución polimérica y se pone una aguja *Terumo*.
3. Se coloca la jeringa en la bomba de 22 V de *GENEQ INC* y en el menú se selecciona el tipo de jeringa, el volumen de solución y un flujo de 5 mL/h.
4. Se cubre la superficie del colector con papel de aluminio para recoger la matriz de fibras.
5. Se conecta la fuente de alimentación *DAMA High Voltage Research* a la jeringa y al colector.
6. Sobre el colector, se añade un cubreobjetos para analizar la muestra en el microscopio óptico.
7. Se cierra la caja protectora y se pone en marcha la bomba

8. Una vez sale por la aguja la primera gota de solución, se pone en marcha la fuente de alimentación a 20 kV.
9. Cuando se observa que el cubreobjetos ya tiene fibras encima, se recoge la muestra y con la ayuda del portaobjetos se analiza en el microscopio óptico.

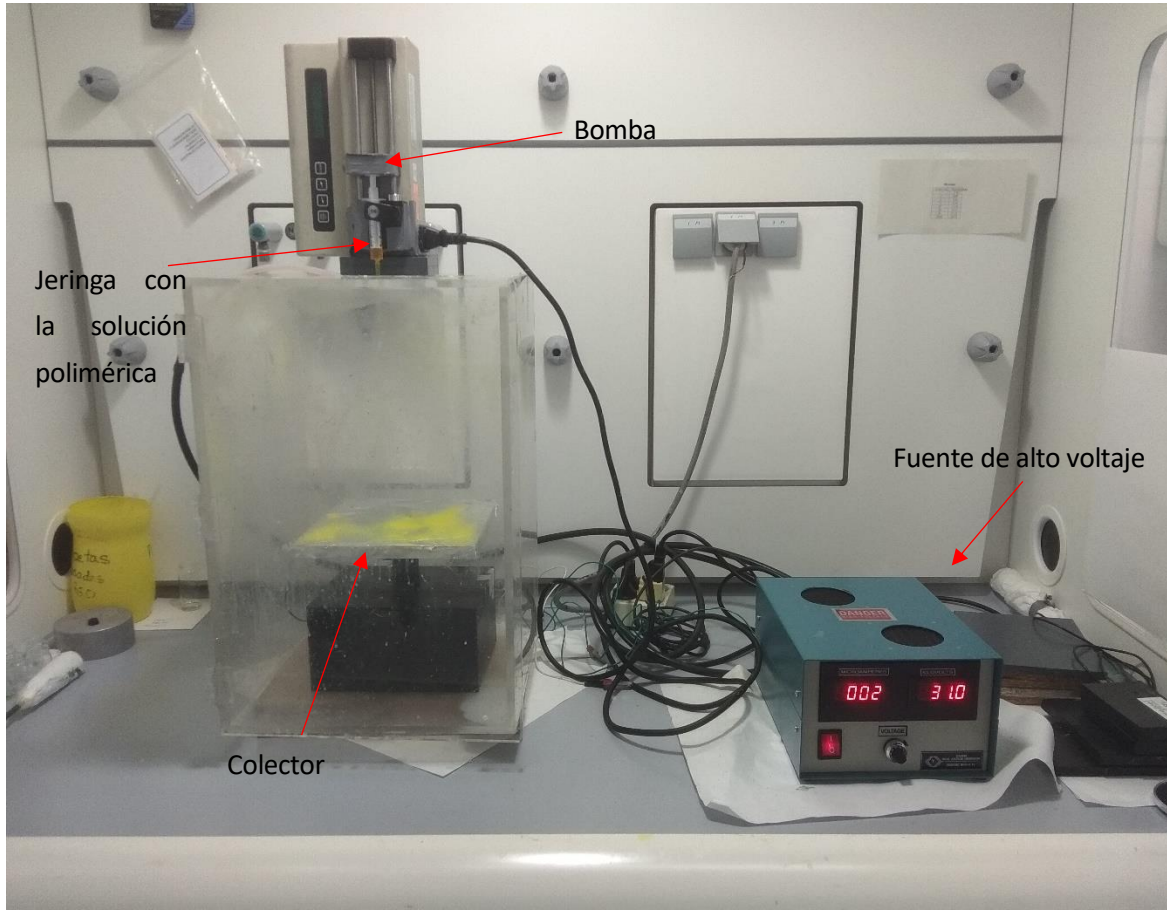


Figura 3.2-2. Montaje utilizado para electrospinning

### 3.2.2.1. Evaluación de las fibras por microscopía óptica

El microscopio óptico *AXIOSKOP 40* se utiliza para estudiar el proceso de elaboración de las nanofibras mediante *electrospinning*. A medida que las nanofibras van cayendo al colector se recogen con un cubreobjetos y se observan a través del microscopio para poder confirmar que se están creando fibras, de esta manera, se pueden corregir las diferentes variables para mejorar el estado de estas. Se han tomado micrografías con la cámara digital *AIXOCAM MRC-5*

Es un instrumento visual basado en lentes ópticas y un haz de luz que penetra la muestra y permite obtener imágenes en escala micro de esta. Las lentes ópticas permiten el aumento de la imagen del objeto observado y la luz que se proyecta hace posible la iluminación del material en observación y la

proyección hacia el sistema de lentes. Manipulando el paso del rayo de luz entre las lentes y el objeto, se puede amplificar la imagen.

### 3.3. Matriz porosa de PEA-8L6: BIO mediante *salt-leaching*

#### 3.3.1. Material

Para obtener la solución polimérica que será utilizada para realizar las estructuras porosas se ha empleado Cloroformo (Chloroform stabilized with amylene, Scharlau) como disolvente, y los polímeros 8L6 y *Bionolle* previamente sintetizados por el laboratorio. Como agente porogénico se utiliza el cloruro de sodio (Sodium Chloride, Sigma-Aldrich)

#### 3.3.2. Matrices porosas mediante *salt-leaching*

Esta técnica es ampliamente utilizada en medicina porque se consigue tener un control sobre la porosidad y el diámetro de los poros en las estructuras porosas que no se logra con otros métodos.

Tal y como se muestra en la Figura 3.3-1 consiste en añadir a una solución polimérica una sal insoluble con un determinado tamaño y dejar que se evapore el solvente, para obtener una estructura sólida, que luego se sumerge en una solución acuosa. De este modo, la sal se disuelve dejando poros del diámetro deseado en la estructura. Estos materiales formados son nombrados *estructuras porosas*, materiales porosos capaces de retener células en su estructura para ser utilizados en biomedicina.

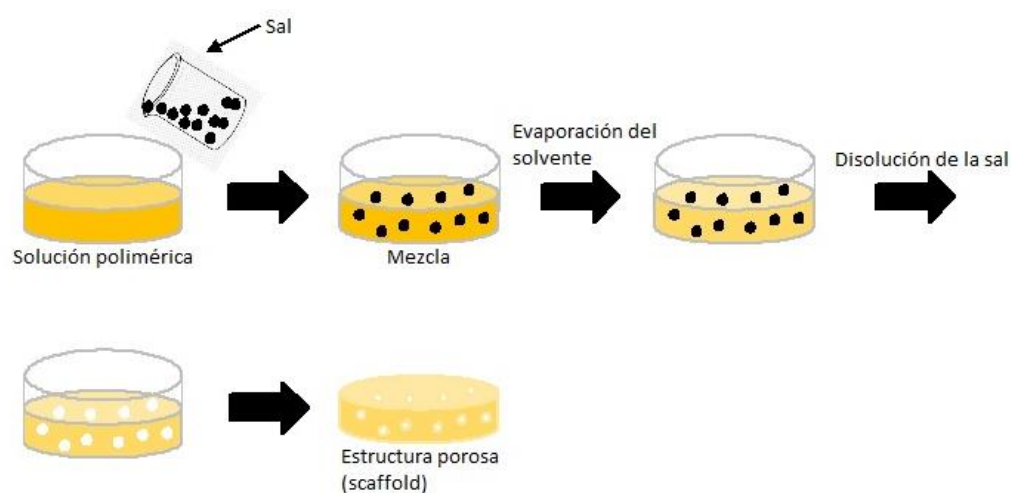


Figura 3.3-1. Pasos a seguir para la obtención de estructuras porosas mediante la técnica de *salt-leaching*

A continuación, se explica el método de elaboración realizado para obtener una matriz porosa de PEA-8L6: BIO:NaCl 25:25 wt% en la cual se resuspende partículas de NaCl al 50%.

1. Se disuelve 1 g de 8L6 en 2,5 mL de  $\text{CHCl}_3$  y, en otro recipiente aparte, 1 g de Bionolle en 5 mL de  $\text{CHCl}_3$ .
2. Una vez disueltas, se mezclan las dos soluciones con la ayuda de un vórtex.
3. Una vez obtenida una solución homogénea, se añaden 2 g de NaCl (previamente tamizados), y se mezcla otra vez en el vórtex para conseguir una distribución uniforme de las partículas en la solución polimérica.
4. Se vuelca la mezcla en una placa Petri de vidrio y se deja en la campana extractora durante 48 horas para conseguir la completa evaporación del solvente.
5. Transcurrido este tiempo, se sumerge la matriz sólida en agua miliQ, tal y como se muestra en la Figura 3.3-2, se mide la conductividad del agua con un conductímetro SANXIN SX-650 y se deja en agitación para conseguir la total disolución del NaCl.
6. Cada 2 horas se mide la conductividad eléctrica del agua del recipiente, para comprobar que se está disolviendo la sal (Si el conductímetro marca un valor mayor que el inicial significa que se está formando una solución salina), y se cambia el agua para evitar que esta llegue a saturarse.

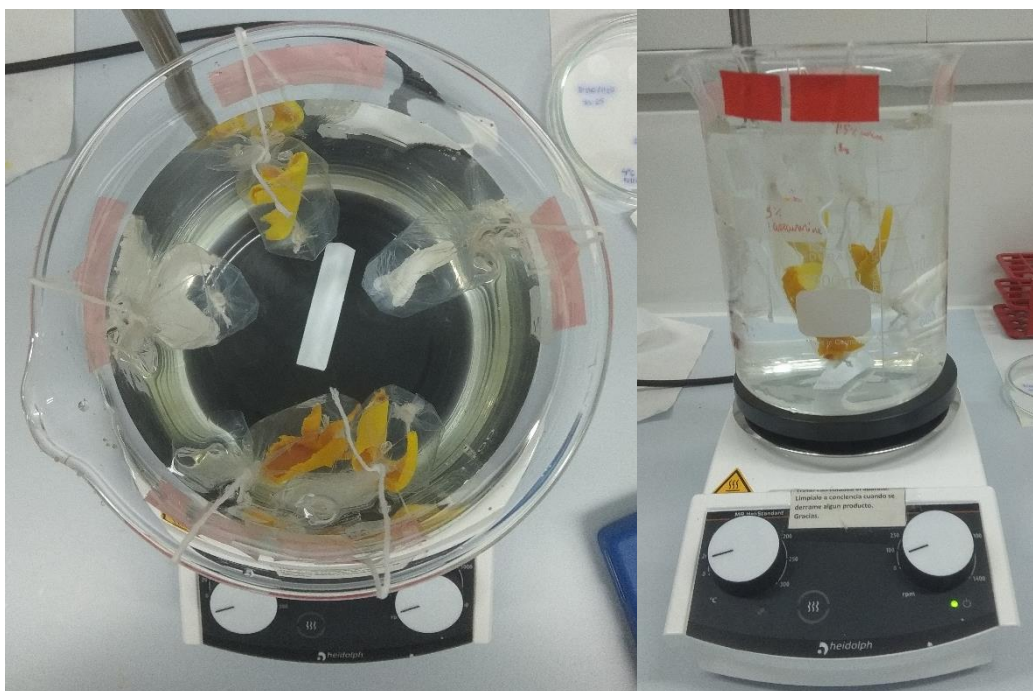


Figura 3.3-2. Recipiente donde se sumergen las diferentes estructuras, que se han incorporado a bolsas de diálisis para hacer más fácil la disolución de toda sal.

### 3.4. Caracterización física y química

#### 3.4.1. Espectroscopia magnética nuclear (RMN)

Actualmente, la espectroscopia magnética nuclear es una de las técnicas de espectroscopia más utilizada[33]. Registrando los enlaces –CH- que tiene la molécula, se consigue identificar la muestra, determinar su estructura y su peso molecular.

Los núcleos atómicos con número másico y atómico impares presentan características magnéticas, debido al espín nuclear, y esta característica es utilizada por la resonancia magnética nuclear. Un espectrómetro RMN consta con un imán, que crea un campo magnético externo, que hace que el núcleo gire y se oriente en función del campo, en un estado mínimo de energía. Un transmisor de radiofrecuencias, que aplica una radiación electromagnética con una determinada frecuencia, para conseguir que todos los espines pasen de un estado de energía menor a uno máximo. Cuando un núcleo se encuentra en este estado, se dice que está en resonancia, debido a que toda la energía recibida la utiliza para cambiar de espín. Y, por último, un detector que mide la energía absorbida por la muestra.

Se utiliza para analizar estructuralmente todos los monómeros y polímeros obtenidos previos a la obtención del hidrogel de PEA-4F4:PEG-DA. Los espectros de RMN de protón se realizan con un espectrómetro *Bruker AMX-300*. Las muestras, de 1 mg, se introducen en tubos de vidrio especiales para RMN y se disuelven con dimetil sulfóxido (DMSO). El software utilizado para procesar las muestras es *TopSpin*.

#### 3.4.2. Espectroscopia magnética infrarroja (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja es utilizada para la identificación de un compuesto y recibe su nombre de la región del espectro electromagnético implicada. Ésta se basa en que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas.

La región del espectro infrarrojo se puede dividir en tres zonas:

- IR cercano (NIR):  $12800\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$
- IR medio:  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$
- IR lejano:  $400\text{--}10\text{ cm}^{-1}$

En el IR medio es donde se encuentran la mayoría de aplicaciones analíticas. El NIR es menos útil para la identificación y se suele utilizar para el análisis cuantitativo de compuestos que contengan agrupaciones funcionales con hidrógenos unidos a carbonos, nitrógenos y oxígenos. Por otro lado, el

IR lejano se utiliza para el análisis de compuestos orgánicos, inorgánicos u organometálicos que contengan átomos pesados[34].

Un espectrómetro IR irradia una luz infrarroja a través de una muestra, la cual la absorbe para hacer vibrar los enlaces químicos presentes en la molécula. El detector determina la fracción de luz que es absorbida y lo muestra en el espectro. Cada enlace químico del compuesto absorbe a diferente longitud de onda. Una gran ventaja de esta técnica es que no requiere de un estado de materia para analizar la muestra.

Todas las muestras se analizan con un espectrómetro JASCO FT-IR 4100 como el de la Figura 3.4-1, en un rango entre 500 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ . El software que se utiliza para obtener los datos es Spectra Manager, los espectros son representados con Excel.



Figura 3.4-1. Espectrómetro JASCO FT-IR 4100.

### 3.4.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una de las técnicas termo analíticas más utilizadas[35]. Permite medir todas las transiciones energéticas que sufre un material, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un intervalo de temperaturas. Por lo tanto, es capaz de determinar:

- Temperaturas de transición o de transformación: Transición vítrea, cristalización, ebullición, sublimación, fusión, ...
- Estabilidad térmica del material
- Capacidad calorífica aparente
- Cinética de cristalización del material



Un calorímetro diferencial de barrido contiene dos cápsulas, una con la muestra y otra de referencia, cada una de ellas con un sistema de calefacción. Se calientan las dos cápsulas a la misma velocidad y el sistema de control corrige todas las diferencias de temperatura que aparezcan entre las dos. De tal manera, que mide cuánto calor adicional ha de suministrarse para que las dos cápsulas estén a la misma temperatura.

Se ha realizado la determinación de las propiedades térmicas del polímero PEA-8L6 y la mezcla polimérica de PEA-8L6:BIO con un calorímetro de flujo de calor *TA Instruments model Q100 DSC* como el de la Figura 3.4-2. La muestra, de aproximadamente 10 mg, se calienta desde temperatura ambiente hasta unos 120-140°C, con una velocidad de calentamiento de 20°C por minuto. En esta fase se obtiene el grado de cristalinidad de la muestra i la temperatura de fusión. Seguidamente se enfría a 10°C por minuto hasta -80°C y de esta manera se consigue saber la temperatura de transición vítrea del polímero en cuestión.



Figura 3.4-2. Calorímetro de flujo de calor *TA Instruments model Q100 DSC*

### 3.5. Caracterización morfológica

#### 3.5.1. Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Un SEM (*Scanning Electron Microscope*) es un microscopio capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de la muestra. La característica principal es que, utiliza lentes

electromagnéticos para dirigir un haz de electrones hacia la muestra, que es excitada y, ésta, emite electrones que son recogidos por un detector para conseguir ver en el monitor una imagen nítida y tridimensional de la muestra en cuestión. El microscopio trabaja al vacío para que el haz de electrones no se desvíe con alguna perturbación.

Se utiliza el microscopio electrónico de barrido para obtener imágenes de la superficie de todas las matrices porosas obtenidas y poder así estudiar su morfología.

Las imágenes se obtienen con un microscopio *Focused Ion Beam Scanning Electron Microscope (FIB-SEM) NEON® Series de Carl Zeiss*, como el de la Figura 3.5-1. Para conseguir observar la muestra se requiere que ésta sea conductora, por lo tanto, se cubren con una capa de carbón en el revestidor *Mitee K950 Sputter Coater*, donde se aplica vacío y se sublima con grafito para conseguir esta propiedad del material. Con el software *SmartSem* se obtienen las imágenes de las muestras.

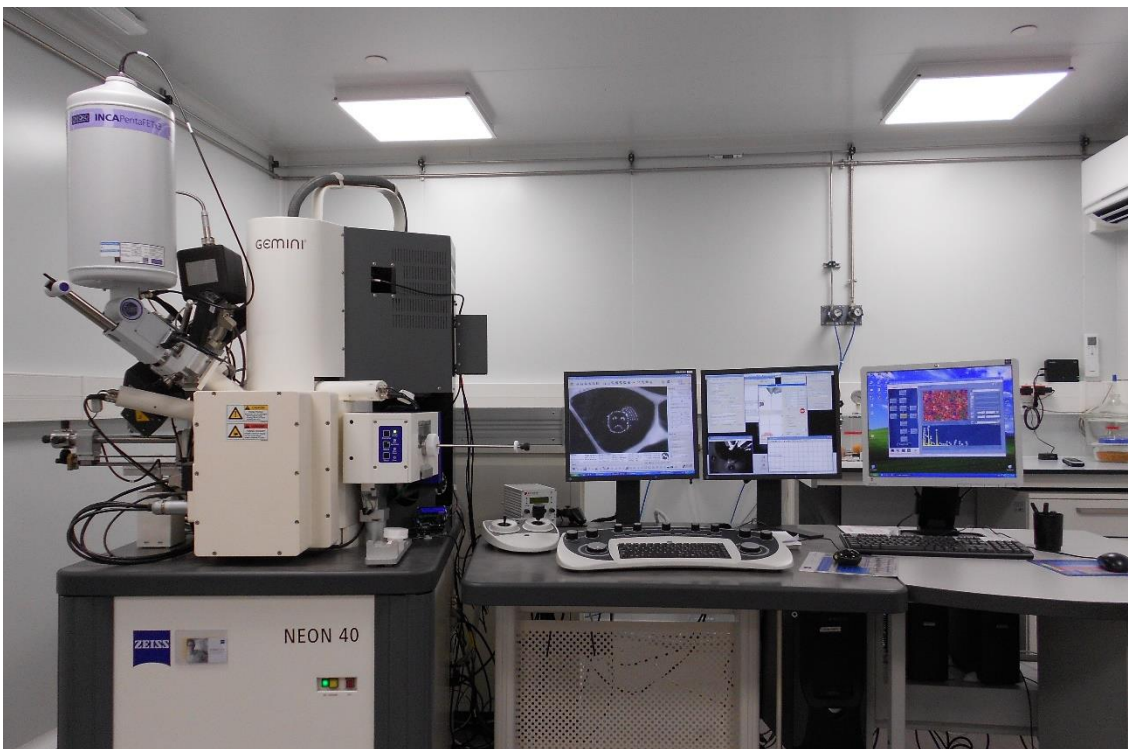


Figura 3.5-1. Fotografía del microscopio FIB-SEM propiedad de la UPC



### 3.6. Carga de fármaco y análisis de la velocidad de liberación

#### 3.6.1. Material

Todas las matrices porosas se han cargado con Curcumina (Curcumin, Sigma-Aldrich). Para realizar el medio de liberación se ha utilizado Etanol (Ethanol 99,8%, HoneyWell), DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) y Azida de sodio del laboratorio (Mn=65,01g).

#### 3.6.2. Carga

Se ha cargado curcumina en todas las matrices porosas sintetizadas, para comparar los distintos tiempos de liberación. En las nanofibras y las placas porosas mediante *leaching* se ha decidido cargar con distintos porcentajes, para tener más información sobre la liberación. Por el contrario, en los hidrogeles, se ha preparado una solución de curcumina y se han sumergido allí las distintas réplicas para conseguir que absorban el máximo posible de curcumina. A continuación, se explica los métodos seguidos para la carga de los materiales.

Para realizar la carga de las nanofibras y las placas porosas mediante *leaching*, se ha disuelto 1 g de PEA-8L6 en 2,5 mL de  $\text{CHCl}_3$  y en otro vial aparte 1 g de *Bionolle* en 4 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Seguidamente, se ha pesado el porcentaje correspondiente de curcumina y se ha disuelto en 1 mL  $\text{CHCl}_3$ . Con un vórtex, se ha mezclado la solución de PEA-8L6 con la de *Bionolle* una homogeneizada se añade la solución de curcumina y se mezcla (Para las placas porosas mediante *leaching*, antes de la curcumina se añaden 2 g de NaCl). Una vez obtenidas las soluciones poliméricas las nanofibras se han llevado a *electrospinning* y las placas porosas se dejan evaporando el solvente para luego sumergirlas en agua y disolver el NaCl.

Puesto que los hidrogeles son materiales capaces de absorber agua e hincharse, para la carga de estos se han disuelto 0,1 g de curcumina en 100 mL de una mezcla de Etanol/Agua al 30% en volumen de EtOH y cada réplica de los hidrogeles, de aproximadamente 10 mg, se ha sumergido en 30 mL de la solución, para que el material absorba la solución y en consecuencia retenga el fármaco en su estructura. Transcurridas 24 horas, se ha liofilizado el hidrogel ya cargado para su posterior liberación.

#### 3.6.3. Modelo de liberación en el medio

Se ha realizado el estudio de liberación de curcumina contenida en las matrices porosas en un medio de PBS/Etanol (30/70 v/v) y el procedimiento seguido ha sido el siguiente:

1. Se prepara el medio de PBS: Se pesan 4,8 g de PBS y 0,15 g de azida sodio y se disuelven en 500 mL de agua miliQ.
2. Se prepara el medio de DPBS/Etanol al 70% en volumen de EtOH.

3. Para cada muestra se hacen 3 trozos de aproximadamente 10 mg, ya que se requieren tres repeticiones, y se colocan en *eppendorfs* de 2 mL y se les añade 1 mL del medio de PBS/Etanol
4. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran los tiempos de recogida de muestras. Cada vez que se recoge 1 mL se añade otro del mismo medio.

Tabla 3.6-1. Tiempos de recogida de las muestras

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tiempo (h)	0,5	1	2	4	6	8	24	48	72	

5. Para hacer las medidas finales, se añade 1 mL de Etanol para que las matrices acaben de liberar todo el fármaco retenido.

Para poder cuantificar la concentración real que hay en cada muestra que se analiza en el UV, se ha tenido que preparar una recta de calibrado de la curcumina en DPBS-Etanol al 70% en volumen de EtOH. Disolviendo 10 mg de curcumina en 1 mL y seguidamente preparando soluciones más diluidas a partir de esta primera, analizándolas por espectroscopia de absorción ultravioleta-visible (UV).

#### 3.6.4. Espectroscopia de absorción ultravioleta-visible (UV)

La espectroscopia de absorción ultravioleta-visible (UV) es una técnica de análisis basada en la cantidad de radiación electromagnética, en el rango de longitudes de onda del ultravioleta-visible, que puede absorber o transmitir una muestra.

Cuando se incide un haz de radiación sobre el material, los fotones chocan con los electrones de la muestra y éstos últimos absorben energía y saltan a un nivel energético superior, pasando a un estado de excitación. La espectroscopia Ultravioleta-visible proporciona información sobre estos cambios de estado entre niveles, información que es utilizada para conocer la estructura electrónica de la muestra.

Se ha utilizado esta técnica para analizar todas las matrices porosas cargadas y conocer la cantidad de curcumina cargada en el material. Se analizan con el espectrofotómetro UV-VIS SHIMADZU UV-3600 con doble haz como el de la Figura 3.6-1. El software para tratar los datos es UVProve.



*Figura 3.6-1. Espectrofotómetro UV-VIS SHIMADZU 3600*

## 4. Resultados i discusió

### 4.1. Hidrogel PEA-4F4:PEGDA

Para obtener el primero de los precursores de la PEA-4F4 se ha hecho reaccionar L-fenilalanina, cis-buten-1,4-diol y ácido p-toluensulfónico en una proporción molar 2:1:2, para extraer la sal del éster de fenilalanina. Si se sigue la reacción, teóricamente, se obtendrían 0.132 moles de agua (2.4 mL), pero se han obtenido 3 mL, debido a que se añade un pequeño exceso de ácido p-toluensulfónico para que reaccione completamente por los dos lados. Este compuesto absorbe mucha humedad y por este motivo se puede apreciar un exceso de agua resultante. Posteriormente se ha llevado a cabo una solución de bicarbonato con el monómero en proporción molar 1:2, que luego se gotea sobre una solución de cloruro de ácido en proporción molar 1, respecto al monómero, para formar el polímero. Debido a que un mol de bicarbonato tiene dos iones, en la primera solución, se consigue formar una sal de p-toluensulfónico, dejando libre los dos extremos de la cadena. Cuando se gotea, el mol de bicarbonato restante se utiliza para contrarrestar los dos iones de ácido clorhídrico que se forman debido a la reacción del cloruro de ácido con el éster de fenilalanina, de esta forma, el pH de la mezcla tiene que ser básico.

La poliesteramida PEA-4F4 y el polímero PEG-DA se utilizan para crear un hidrogel que es cargado con un fármaco, para observar la velocidad de liberación. La molécula de PEA-4F4 forma la estructura principal de las cadenas, y el PEG-DA se utiliza como agente entrecruzante. Con el uso de la luz ultravioleta y el compuesto *Igracur*, que actúa como agente foto-activador del radical de las cadenas de PEA-4F4, las cadenas de PEA-4F4 se entrelazan con el PEG-DA formando así una estructura de red entrecruzada. Para comprobar cómo afecta en la morfología de estos materiales tener un grado de reticulación diferente, se ha decidido realizar dos hidrogeles, con cantidades de PEG-DA diferentes. En la Tabla 4.1-1 se muestra las cantidades de polímeros utilizadas para la reacción.

Tabla 4.1-1. Cantidades de polímeros y solventes utilizadas en los distintos hidrogeles

Hidrogel (W <sub>4F4</sub> :W <sub>PEGDA</sub> )	Peso de PEA-4F4 (g)	Peso de PEG-DA (g)	Peso de Igracur (g)	Disolvente (mL)
1/4	0,16	0,64	0,032	4
1/2	0,16	0,32	0,032	2

A continuación, en la Figura 4.1-1 se muestran fotografías de los distintos hidrogeles.

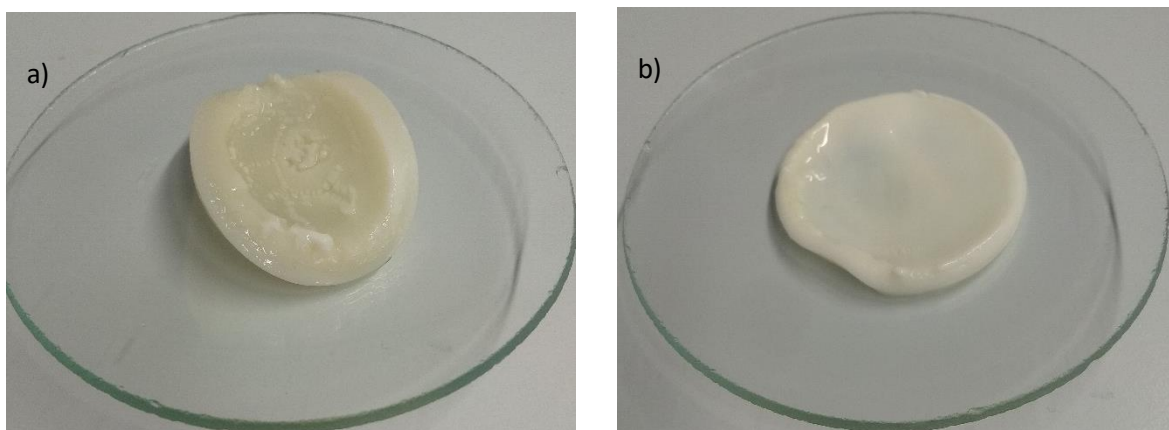


Figura 4.1-1. a) Fotografía del hidrogel de PEA-4F4:PEG-DA 1:4 ( $W_{4F4}:W_{PEG-DA}$ ) b) Fotografía del hidrogel de PEA 4F4:PEG-DA 1:2 ( $W_{4F4}:W_{PEG-DA}$ )

## 4.2. Matriz de fibras

En este apartado se explican los resultados obtenidos en la realización de las nanofibras de 8L6 y en la mejora de las características térmicas de éstas con la adicción del poliéster *Bionolle*. Antes de llevar la solución a *electrospinning* hay que tener en cuenta diversos parámetros de la preparación de esta, como la concentración de polímero y el disolvente que se va a utilizar. Se requiere que los polímeros y el fármaco sean solubles en el disolvente, para poder llevar la solución a electrohilado. Por este motivo, el disolvente escogido ha sido  $CHCl_3$  dado que los dos polímeros y la curcumina son solubles en el mismo.

El proceso de obtención de las fibras ha sido observado por el microscopio óptico. De esta manera se pueden corregir las condiciones operacionales para obtener unas fibras de calidad. Es decir, sin defectos, como los beads, que son gotas de polímero que no se han conseguido estirar para formar fibras.

### 4.2.1. Fibras de PEA-8L6

Otro punto importante para realizar la solución polimérica con las características adecuadas para obtener fibras es la concentración del polímero, por este motivo se ha realizado soluciones con diferentes concentraciones y se han llevado a *electrospinning* con las condiciones operacionales mencionadas en los métodos. En la Tabla 4.2-1 se muestra un resumen de las concentraciones de dichas soluciones y los resultados.

Tabla 4.2-1. Soluciones de 8L6 realizadas para la obtención de fibras

	Polímero	Solvente	Concentración (g <sub>polímero</sub> /mL <sub>disolvente</sub> )	<i>Electrospinning</i>
1	8L6	CHCl <sub>3</sub>	1/5	NO
2	8L6	CHCl <sub>3</sub>	1/2,5	SI

Como se puede observar, la solución 2 es la única que a las condiciones iniciales es capaz de crear fibras, así que se ha escogido esta segunda para la obtención de la matriz.

Para la realización de estas fibras, no ha hecho falta cambiar los parámetros de electrohilado iniciales, ya que se han obtenido fibras en buenas condiciones nada más empezar, como se puede observar a continuación, en la Figura 4.2-1 a) realizada con el microscopio óptico.

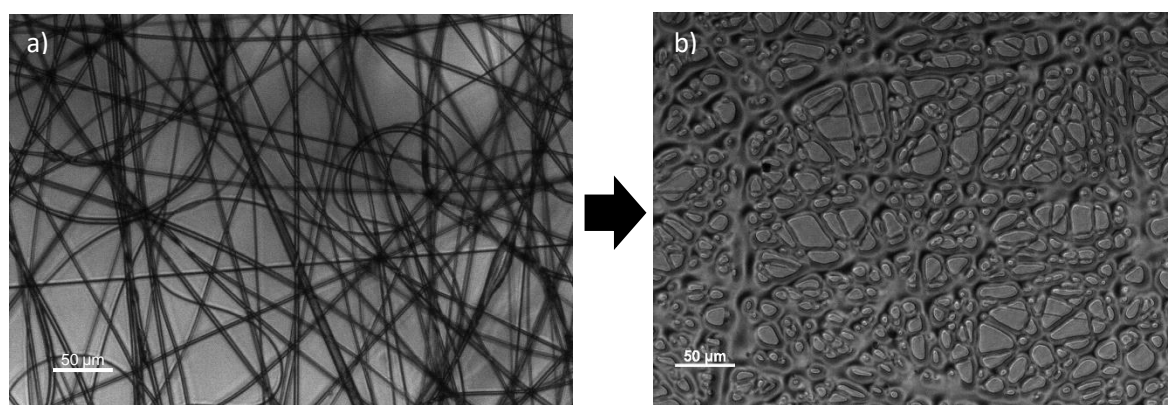


Figura 4.2-1. a) Nanofibras de PEA-8L6 el mismo día de ser obtenidas b) Nanofibras de PEA-8L6 24 horas después de su obtención

Las fibras, se han dejado en la campana de extracción durante 24 horas para la evaporación completa del solvente y como se aprecia en la Figura 4.2-1. b), transcurrido este tiempo se han fundido en el colector, lo que indica que la poliesteramida 8L6 no es estable térmicamente. Por este motivo, se ha realizado un estudio por DSC.

#### 4.2.2. Fibras de PEA-8L6:BIO

Como no se puede realizar ningún estudio de liberación de fármacos con fibras que no son estables térmicamente, se ha decidido mejorar el material con *Bionolle*. En este caso, la solución inicial se muestra en la Tabla 4.2-2.

Tabla 4.2-2. Concentraciones de la solución inicial llevada a electrospinning

Polímero	Disolvente	Concentración (g <sub>8L6</sub> /mL <sub>Disolvente</sub> )	Concentración (g <sub>Bionolle</sub> /mL <sub>Disolvente</sub> )
8L6/Bionolle	CHCl <sub>3</sub>	1/2,5	1/10

Esta solución se ha llevado a *electrospinning* y se ha seguido el proceso mediante microscopía óptica, de este modo se pueden cambiar los parámetros operacionales o de la solución para la obtención de fibras. A continuación, en la Figura 4.2-2, se muestra la secuencia de estandarización que se ha realizado.

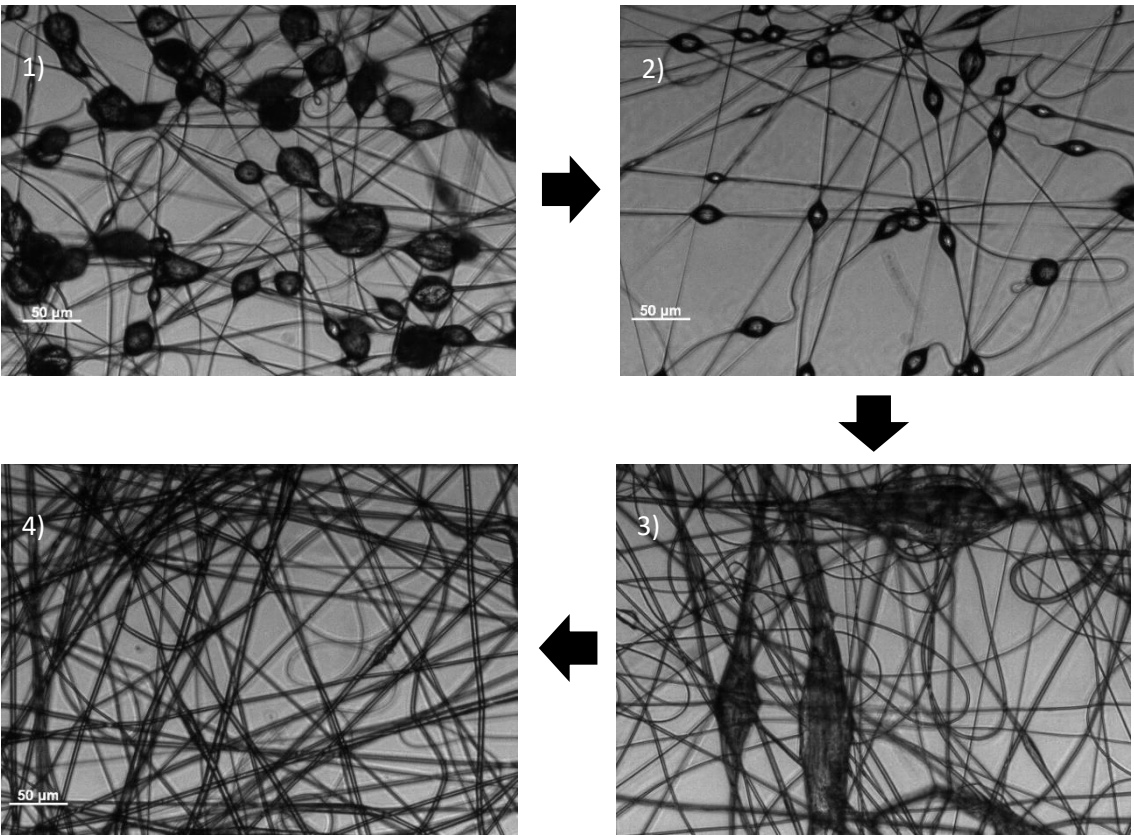


Figura 4.2-2. 1) Concentración 1g Bionolle/10 mL CHCl<sub>3</sub> y 20 kV 2) Concentración 1 g Bionolle/10 mL de CHCl<sub>3</sub> y 25 kV 3) Concentración 1 g Bionolle/5 mL de CHCl<sub>3</sub> 4) Nanofibras de 8L6 y Bionolle finalmente obtenidas con una concentración de 1 g Bionolle/ 5 mL de CHCl<sub>3</sub>

En la Figura 4.2-2.1) se puede apreciar la aparición de fibras, pero con defectos, que son los denominados *beads*. Estos errores aparecen cuando la tensión superficial de la solución es elevada y el voltaje aplicado no es el suficiente como para romper esta tensión y formar las fibras, por este motivo se ha decidido aumentar el voltaje a 25 kV y se observa una disminución en número y tamaño de estos *beads*, pero siguen apareciendo en todas las fibras, así que se ha decidido aumentar la



concentración de *Bionolle* en la solución para obtener un líquido más viscoso que no ofrezca una tensión superficial tan grande. En la Figura 4.2-2.3) se observa una mejora considerable respecto a las fibras anteriores, pero, aun aparece algún defecto, y, por último, se ha decidido aumentar la tensión aplicada hasta 31 kV para acabar de corregir estos errores. Como se aprecia en la Figura 4.2-2.4), las nanofibras obtenidas ya no tienen defectos en sus estructuras y están listas para su carga. En la Tabla 4.2-3 se muestran los parámetros necesarios para la obtención de fibras de calidad de la mezcla de 8L6 y *Bionolle*.

Tabla 4.2-3. Parámetros de solución y operacionales estandarizados para la obtención de fibras

Polímero	Disolvente	Concentración (g <sub>8L6</sub> /mL <sub>Disolvente</sub> )	Concentración (g <sub>Bionolle</sub> /mL <sub>Disolvente</sub> )	Voltaje (kV)	Flujo (mL/h)
8L6/Bionolle	CHCl <sub>3</sub>	1/2,5	1/5	31	5

Para demostrar que se han mejorado las propiedades térmicas de las fibras iniciales, se ha realizado un DSC de la mezcla de 8L6 y *Bionolle*.

### 4.3. Matriz porosa PEA-8L6:BIO mediante *salt-leaching*

Para obtener la matriz porosa mediante *salt-leaching*, hay que seleccionar la cantidad adecuada de sal que se va a añadir a la solución polimérica, debido a que poca cantidad genera placas sin interconectividad entre los poros y en consecuencia disminuye el crecimiento de células en un organismo. Y, si se añade demasiada sal, las partículas se aglomerarán formando poros muy grandes. Por este motivo, se han añadido 2 g de sal a la mezcla, para obtener una matriz de PEA-8L6:BIO:NaCl 25:25:50 wt%. Previamente, se ha tamizado las partículas de sal a un diámetro de 150 µm pues se ha considerado que los poros que dejará en la matriz serán suficientemente grandes como para retener las células en un tejido y favorecer la proliferación de éstas. En la Figura 4.3-1 se muestra la placa porosa obtenida. Como se puede observar, la placa porosa queda dividida en dos, y los extremos enrollados. Esto se debe a la rápida evaporación del solvente en distintas zonas de la matriz. Durante el proceso de evaporación, queda una fina capa polimérica que se acaba dividiendo.





Figura 4.3-1. Fotografía de la placa porosa de PEA-8L6:BIO antes de ser sumergida

Para conseguir que toda la sal de la placa se disuelva en agua y se obtengan poros se ha mantenido en agitación durante 72 horas. Puesto que cada hora que pasa, se va disolviendo más sal, se ha cambiado el agua cada 5 horas, para evitar que la solución se sature y conseguir liberar todo el NaCl retenido en la placa. Transcurrido este tiempo, el conductímetro ya no marcaba por encima del nivel inicial así que se ha decidido terminar. A simple vista, se aprecia que el color de la placa polimérica es más opaco, lo que indica que la sal se ha disuelto, puesto que el brillo vítreo es característico del NaCl.

## 4.4. Caracterización físico-química

### 4.4.1. Hidrogel PEA-4F4:PEG-DA

Durante todo el proceso de síntesis, se han analizado mediante FT-IR y RMN todos los compuestos necesarios para la obtención del hidrogel de PEA-4F4:PEG-DA. Este análisis ayuda a comprender la estructura molecular de los materiales para comprobar que se están obteniendo los productos deseados. El espectro de FT-IR nos da una información relativa al tipo de enlaces que se encuentran en una molécula determinada. Es una técnica simple que nos permite ver de una forma fácil si una reacción química ha tenido lugar. Por ejemplo, la aparición de enlaces correspondientes a los grupos éster después de un proceso de esterificación. Por otro lado, el espectro de RMN permite diferenciar los hidrógenos presentes en una molécula en función de su entorno electronegativo y por tanto nos da una información básica sobre la estructura química de un determinado compuesto.

A continuación, en la Figura 4.4-1, se observa el espectro FT-IR de la sal del ácido de di-*p*-toluensulfónico, compuesto previo a la formación de la PEA-4F4. En este caso, las bandas principales son las de  $1750\text{ cm}^{-1}$ , asociada al grupo carboxilo ( $\text{C=O}$ ), y las que aparecen a  $1143\text{ cm}^{-1}$  y  $1079\text{ cm}^{-1}$  que indican la formación del éster ( $\text{C-OC(O)}$ ). Aproximadamente a  $3000\text{ cm}^{-1}$  se puede observar los picos asociados a las vibraciones de tensión del enlace C-H que forman parte de insaturaciones (doble enlace

o anillo aromático). La banda de  $1690\text{ cm}^{-1}$  indica el doble enlace alqueno ( $\text{C}=\text{C}$ ) y a  $1200\text{ cm}^{-1}$  se aprecia el pico del grupo amina ( $\text{C}-\text{N}$ ).

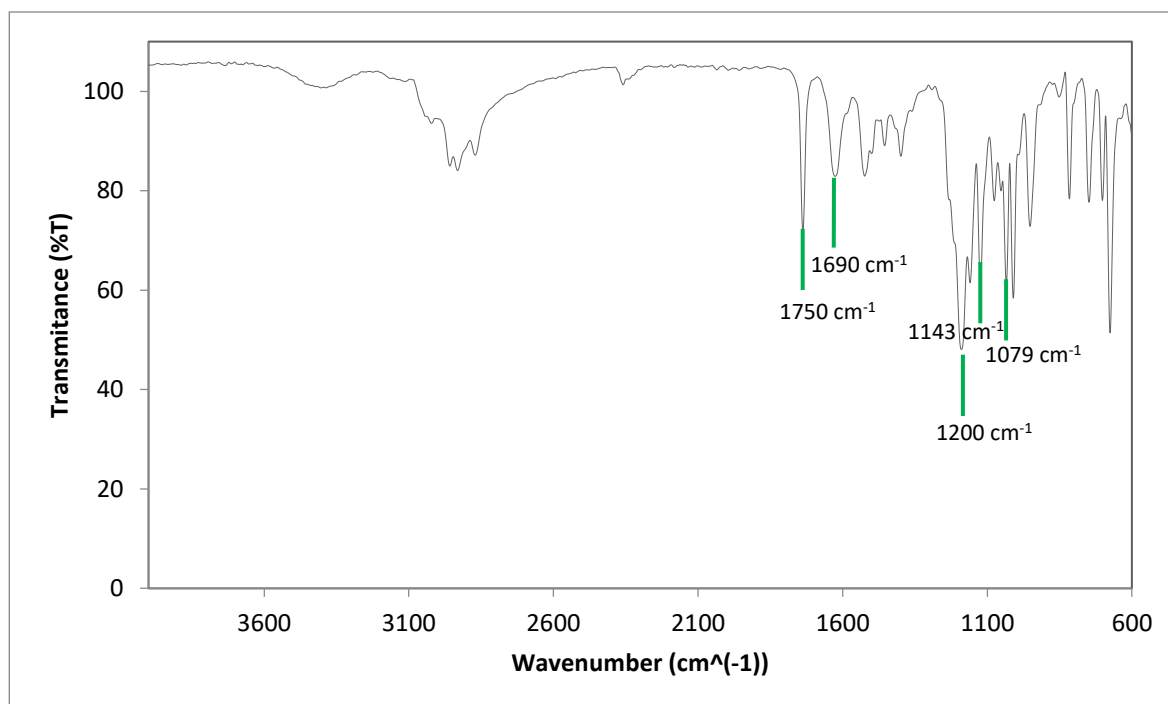


Figura 4.4-1. Espectro FT-IR de la sal del ácido di-*p*-toluensulfónico del éster de fenilalanina

Seguidamente, para acabar de demostrar que el compuesto obtenido es el deseado, se muestra el espectro RMN, en la Figura 4.4-2. La primera señal, a 2,31 ppm, corresponde al grupo metileno terminal del *p*-toluensulfónico ( $\text{CH}_3\text{-Ph-SO}_3$ ), puesto que no tiene ningún protón vecino, la señal aparece como un singulete. A 3,1 ppm se observa un multiplete complejo que integra sobre dos protones y que corresponde la unidad de fenilalanina ( $^+\text{NH}_3\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-Ph})^-$ ). La señal es peculiar ya que los dos protones se diferencian entre sí debido a la asimetría de la molécula y a que se producen acoplamientos entre ellos y con el protón del grupo CH vecino. La señal a 4,29 ppm indica el protón del grupo CH unido a la amina ( $^+\text{NH}_3\text{-CH}(\text{CH}_2\text{Ph})^-$ ), la señal viene representada como un triplete, puesto que el carbono vecino tiene dos protones. A continuación, a 4,68 ppm se aprecia un doblete que integra dos protones y que corresponden al grupo  $\text{CH}_2$  de la unidad de diol ( $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{}$ ). La multiplicidad es dos debido a que solo existe un protón en los átomos vecinos. A 5,51 ppm se observa la señal del protón del grupo metino ( $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{}$ ). Los protones de este grupo solo se acoplan con los del grupo metileno (dando lugar a un triplete) puesto que la simetría de la unidad hace que el protón del grupo  $=\text{CH}$  vecino sea idéntico. Entre 7,10 y 7,50 ppm se observa la señal de los protones aromáticos de la molécula de fenilalanina y del ácido *p*-toluensulfónico. En la imagen ampliada se puede observar mejor la configuración de estas señales. Aparecen dos dobletes iguales, a 7,10 y 7,50 ppm. Estos, corresponden a los protones aromáticos del grupo fenil de la unidad de ácido *p*-toluensulfónico. Puesto que hay dos parejas de protones idénticos, pero una tiene el grupo metilo a un lado y la otra tiene el

azufre, que es más electronegativo, aparecen dos picos separados. Los dobletes se deben a que cada protón solo tiene un hidrógeno vecino. En la fenilalanina, hay dos parejas de protones idénticos y el que queda al extremo de la cadena, por este motivo aparecen 3 dobletes. La última señal, que aparece a 8,48 ppm corresponde a los protones del grupo amina ( $^+\text{NH}_3\text{-CH}(\text{CH}_2\text{Ph})^-$ ).

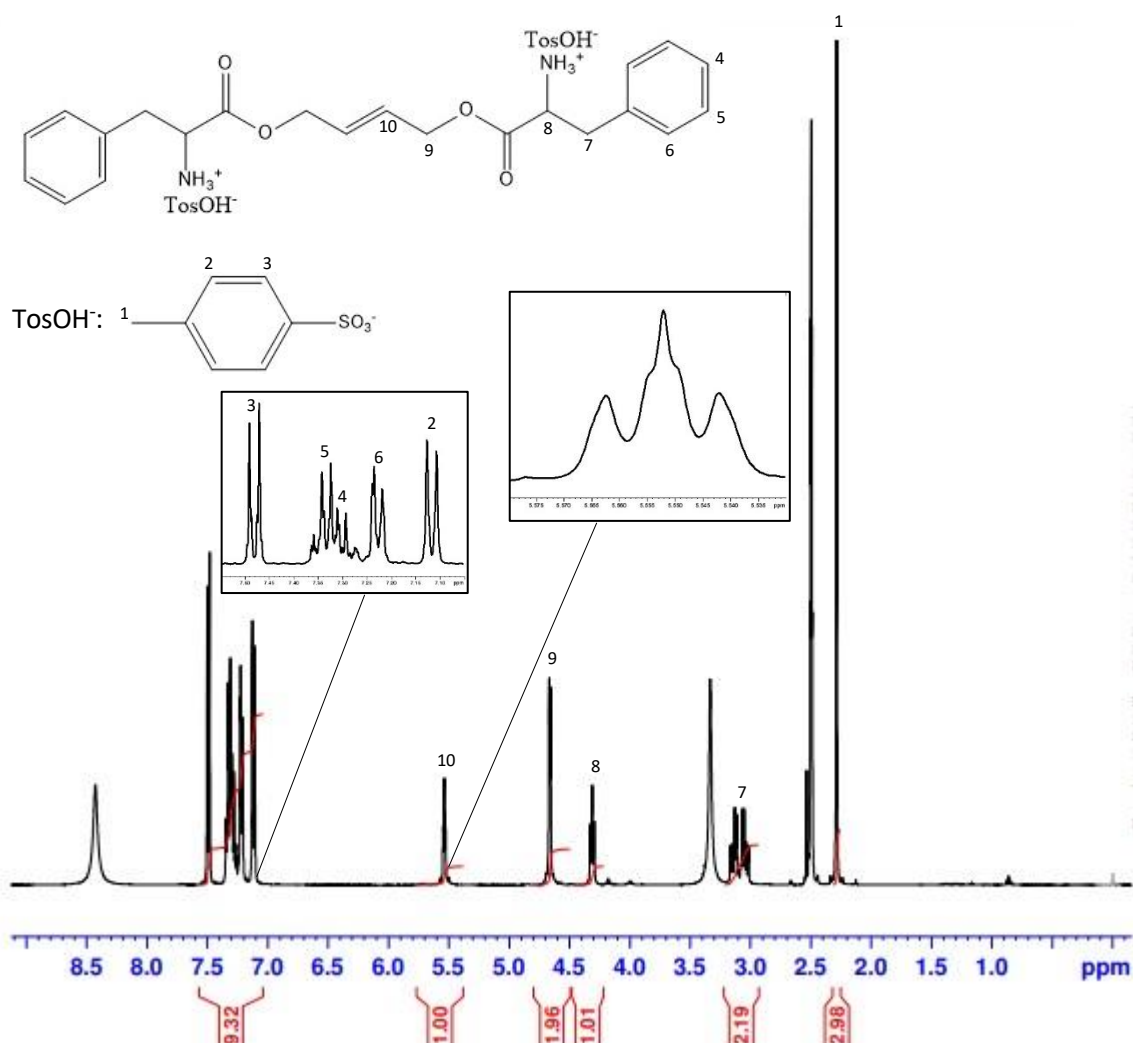


Figura 4.4-2. Espectro RMN de la sal del ácido di-p-toluensulfónico del éster de fenilalanina

Una vez obtenido el compuesto precursor, se ha podido realizar la polimerización y obtener así la PEA-4F4. En la Figura 4.4-3, se muestra el espectro FT-IR del polímero, donde las bandas que indican la formación del compuesto son las que corresponden a la formación del grupo amida. Éstas aparecen a  $3328\text{ cm}^{-1}$  (Amida A asociada a la vibración de tensión NH),  $1634\text{ cm}^{-1}$  (Amida I asociada principalmente a la vibración de tensión del grupo C=O) y  $1530\text{ cm}^{-1}$  (Amida II, asociada principalmente a la flexión del grupo NH). A  $3012\text{ cm}^{-1}$  aparece el pico de la tensión de enlace =C-H del butanediol.

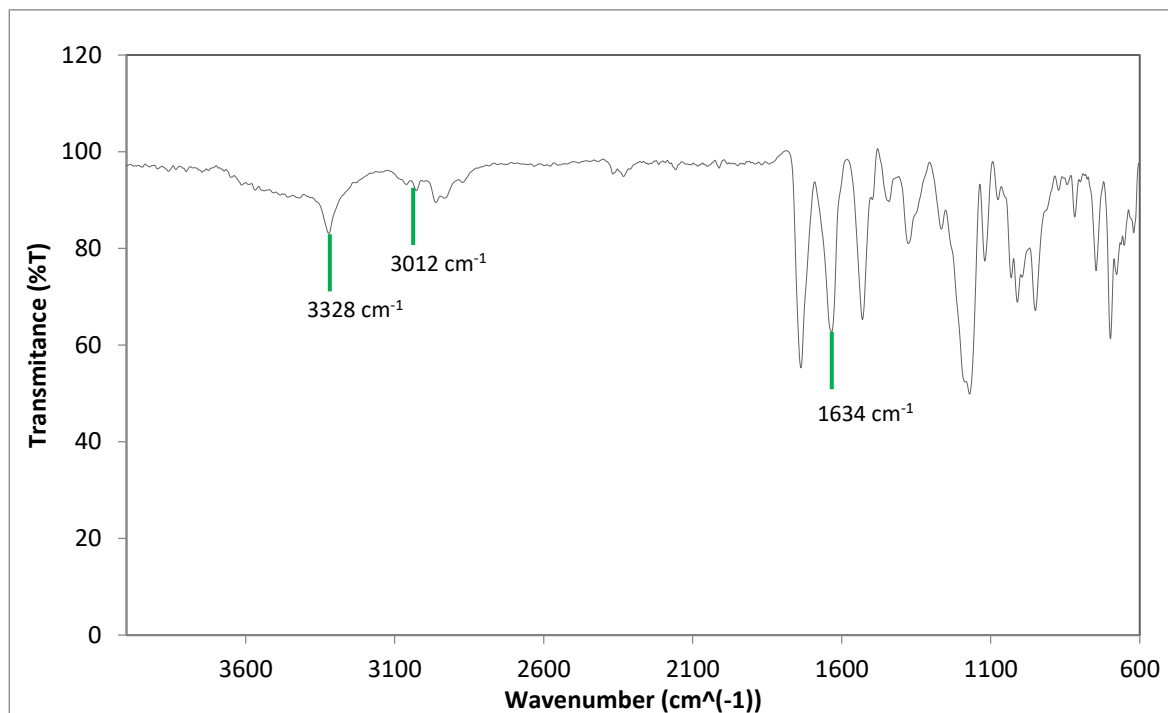


Figura 4.4-3. Espectro FT-IR del polímero PEA-4F4

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de este compuesto se muestra en la Figura 4.4-4. La primera señal a 2,49 ppm corresponde a los dos protones unidos a un carbonilo de la unidad de succínico ( $-\text{NH}(\text{O})\text{C}-\text{CH}_2-$ ), puesto que esta molécula es simétrica, los protones de los dos grupos  $\text{CH}_2$  de la unidad son idénticos y por tanto no existe acoplamiento. La señal es por tanto un singulete. A 2,98 ppm aparece una señal que integra por dos protones y que corresponden al metileno lateral de la unidad de fenilalanina ( $\text{PhCH}_2-$ ). La siguiente señal, a 4,47 ppm corresponde al grupo metino de la fenilalanina ( $-\text{HN}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{Ph})-\text{C}(\text{O})-$ ). En este caso, la señal se ve afectada por los dos protones del carbono unido a un extremo y el protón del nitrógeno, por este motivo aparece un multiplete. A 4,60 ppm, se observa la señal correspondiente a dos protones de la cadena del diol entre el doble enlace y el grupo carbonilo ( $-(\text{O})\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ ), solo tienen un protón vecino así que la señal aparece como doblete. El pico correspondiente al protón del alqueno ( $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ ) aparece a 5,51 ppm en forma de triplete, puesto que a un extremo tiene un carbono simétrico y al otro tiene dos protones. Hay 5 protones aromáticos que dan lugar a una señal compleja a 7,20 ppm. Esta señal es interesante puesto que demuestra la pérdida de los grupos de *p*-toluensulfonato que se espera según la reacción propuesta. Por último, a 8,39 ppm, se puede observar el pico correspondiente al grupo amida ( $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_2\text{Ph})-$ ).

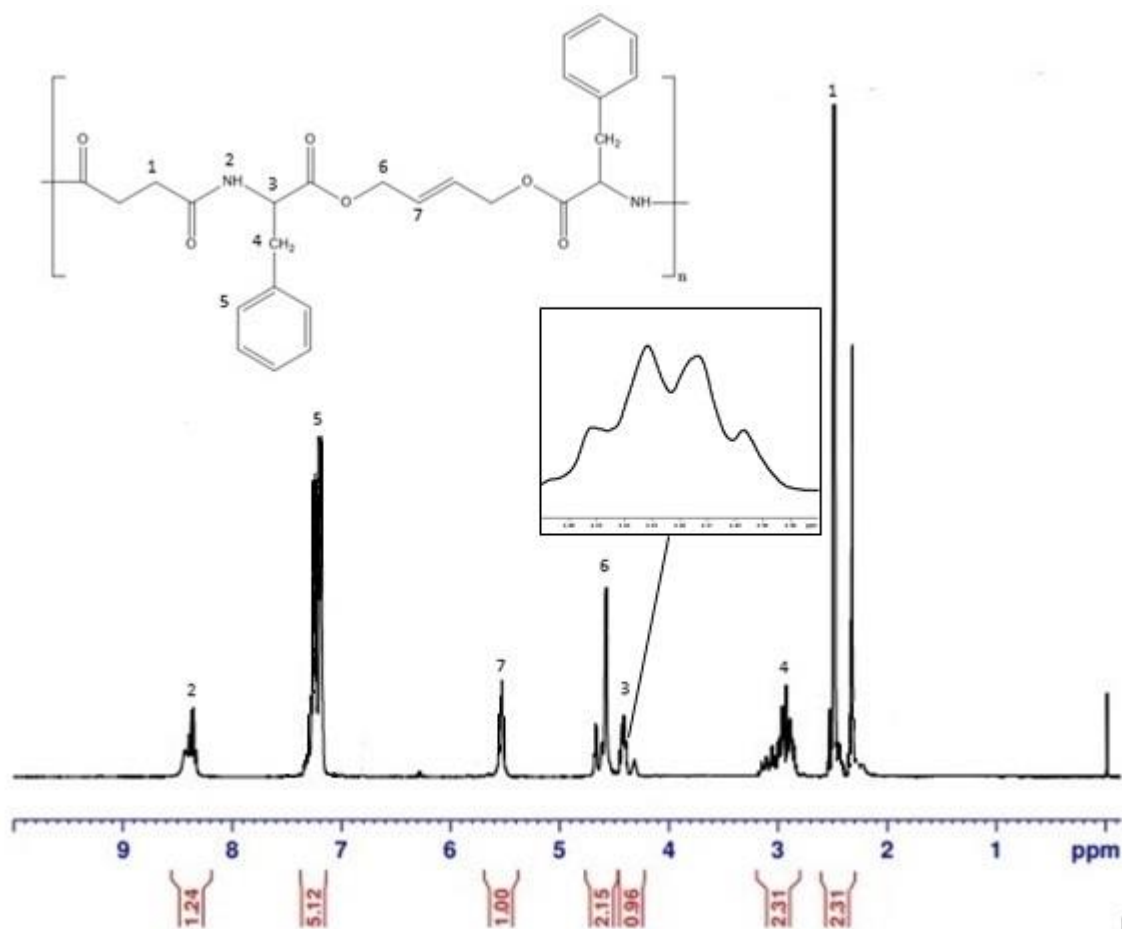


Figura 4.4-4. Espectro RMN de la PEA-4F4

Para la formación del hidrogel, se ha sintetizado previamente el compuesto PEG-DA, que actuará como agente entrecruzante de las cadenas poliméricas del PEA-4F4. En la Figura 4.4-5 se muestra el espectro FT-IR del compuesto. El pico de  $1723\text{ cm}^{-1}$  corresponde al grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) de la unidad de acrilato y los picos de  $1279\text{ cm}^{-1}$  y  $1059\text{ cm}^{-1}$  representan su enlace simple  $\text{C}-\text{O}$  del grupo éster ( $\text{O}-\text{C}(\text{O})$ ). La banda más intensa a  $1096\text{ cm}^{-1}$  indica el grupo éter de la unidad repetitiva.

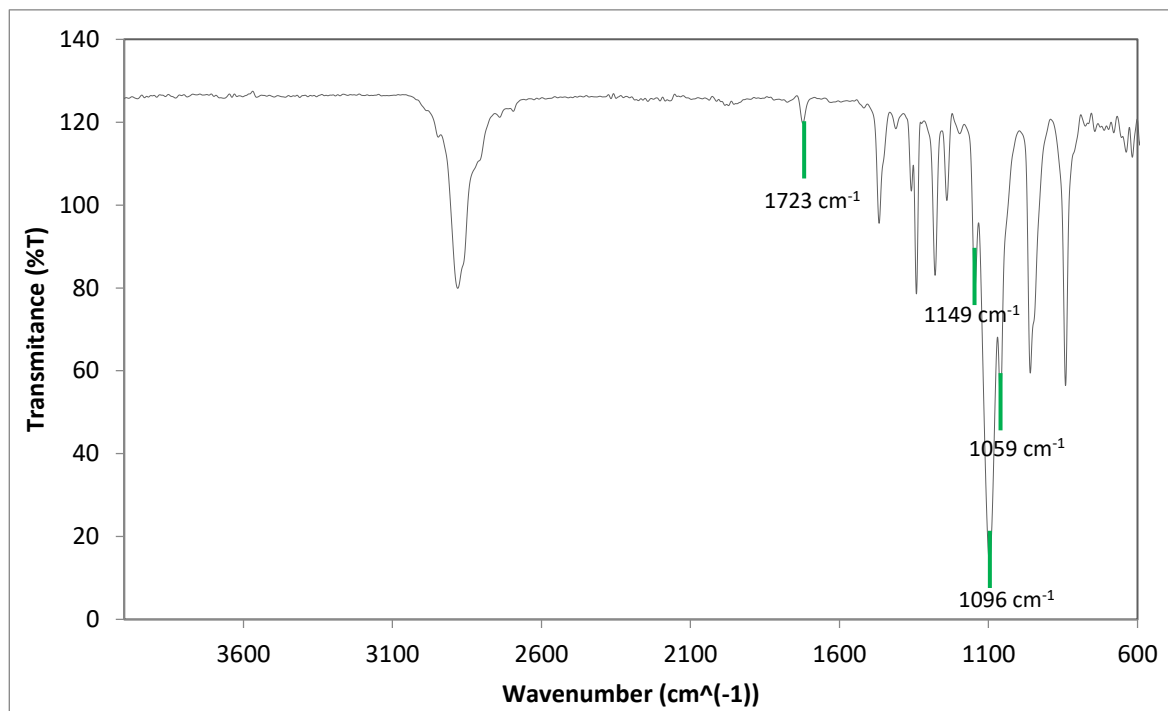


Figura 4.4-5. Espectro FT-IR del polímero PEG-DA

En el espectro RMN de la Figura 4.4-6, se observa una primera señal a 3,63 ppm que indica el pico del grupo alquilo de la cadena repetitiva ( $-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}-$ ), por este motivo, integra un valor muy elevado (398). Los dos protones que tiene de vecinos son idénticos, y por lo tanto no hay acoplamiento spin-spin y aparece un singulete. A 4,32 ppm y 3,71 ppm aparecen las señales de los dos grupos metileno de las unidades de glicol vecinas a los terminales de acrilato. Las señales correspondientes a los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}$  del acrilato terminal pueden también apreciarse claramente. Los dos protones del metileno se diferencian (5,85 y 6,43 ppm) debido a ver un entorno químico distinto que está motivado por la restricción de giro alrededor del doble enlace, posteriormente estas señales se desdoblan por efecto del acoplamiento. A 6,12 ppm aparece la señal asociada al protón del grupo  $\text{CH}$  que aparece como triplete debido a sus protones vecinos.

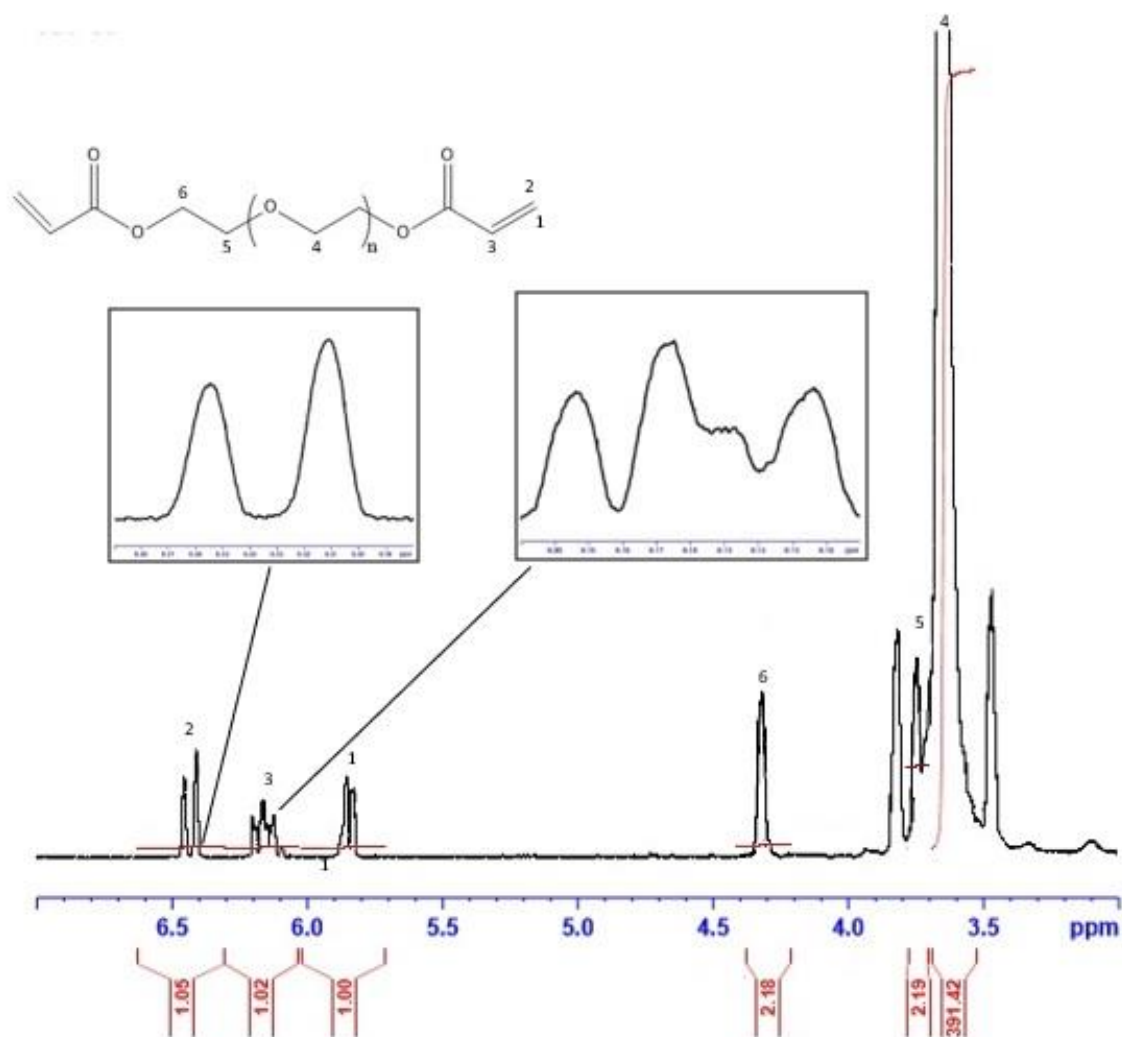


Figura 4.4-6. Espectro RMN del PEG-DA

Finalmente, en la Figura 4.4-7, se muestra el espectro del hidrogel PEA-4F4:PEG-DA. Puesto que el hidrogel es una estructura que no se puede disolver, debido a las fuertes fuerzas entre las cadenas entrecruzadas, solo se ha podido obtener un espectro FT-IR. En este, se pueden apreciar la banda del grupo éter correspondientes al PEG-DA ( $1099\text{ cm}^{-1}$ ), las bandas del carbonilo ( $1739\text{ cm}^{-1}$ ) y las del grupo éster de los dos polímeros ( $1146\text{ cm}^{-1}$  y  $1056\text{ cm}^{-1}$ ) y las bandas del grupo amida del polímero PEA-4F4 (amida A, amida I y amida II a  $3328\text{ cm}^{-1}$ ,  $1646\text{ cm}^{-1}$  y  $1523\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente). Como se puede observar, el pico asociado a la tensión de enlace  $=\text{C-H}$ , que debería aparecer hacia  $3000\text{ cm}^{-1}$ , ya no se aprecia, por lo que se podría deducir que se ha llevado a cabo un cierto grado de entrecruzamiento entre las cadenas del polímero.

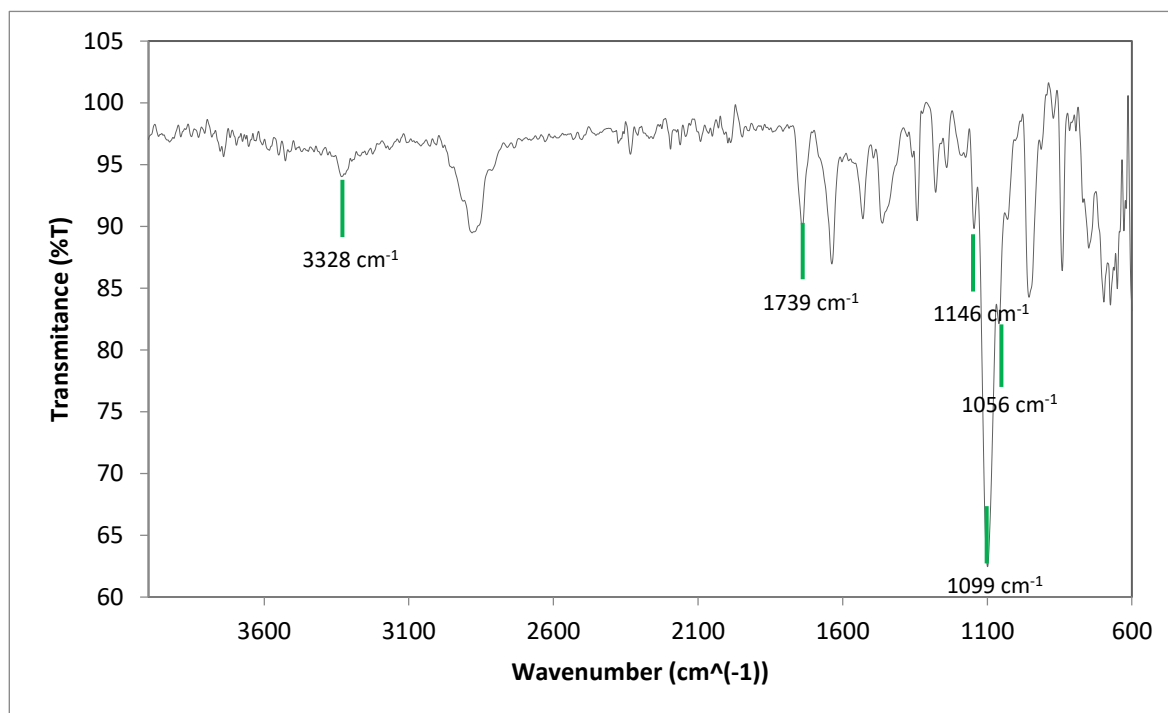


Figura 4.4-7. Espectro FT-IR del hidrogel PEA-4F4:PEG-DA

#### 4.4.2. Fibras de PEA-8L6:BIO

En el espectro FT-IR de las nanofibras de PEA-8L6:BIO que se muestra en la Figura 4.4-8 se puede observar las bandas amida A, amida I y amida II del polímero PEA-8L6, a  $3309\text{ cm}^{-1}$ ,  $1645\text{ cm}^{-1}$  y  $1535\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. El grupo éster del Bionolle y del PEA-8L6 queda representado por el enlace carbonilo (C=O) a  $1737\text{ cm}^{-1}$  y la tensión de enlace C-O a  $1156\text{ cm}^{-1}$ .



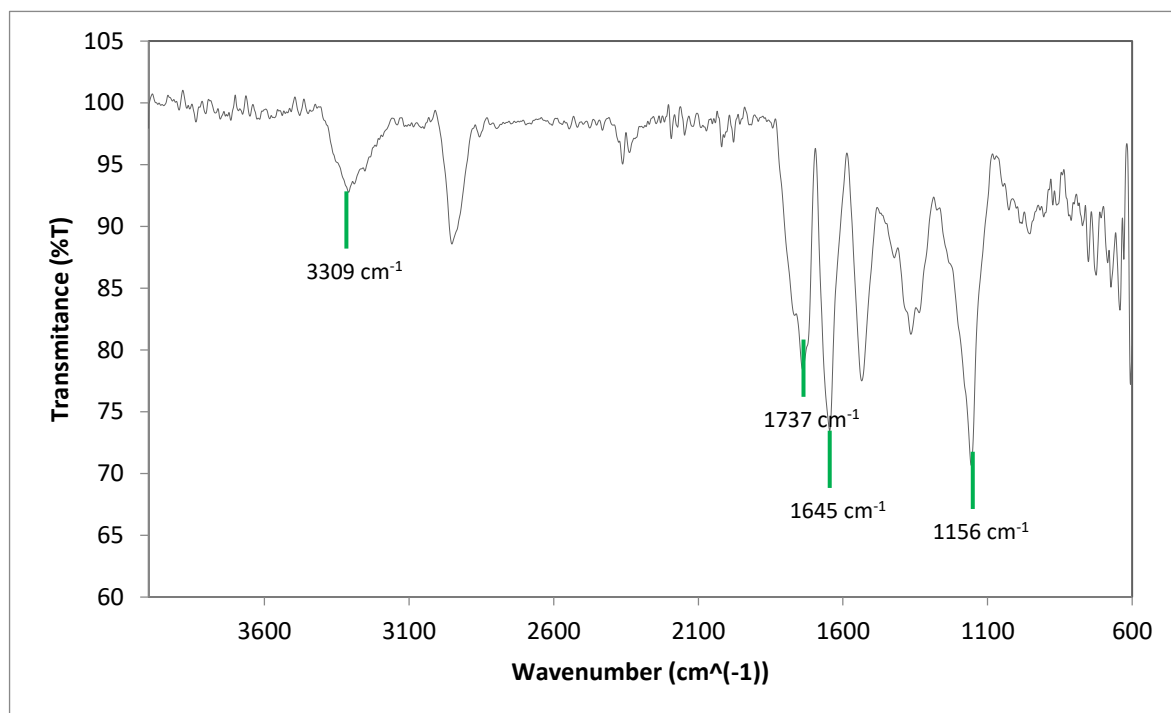


Figura 4.4-8. Espectro FT-IR de las fibras de PEA-8L6:BIO

#### 4.4.3. Matriz porosa PEA-8L6:BIO mediante *salt-leaching*

Como se puede ver en la Figura 4.4-9, el espectro FT-IR obtenido de las placas porosas de PEA-8L6:BIO ha salido prácticamente igual que el de las fibras, puesto que son los mismos polímeros. Las bandas características del polímero PEA-8L6 son las correspondientes a los grupos amida y al éster. Específicamente las bandas amida A, amida I y amida II a  $3315\text{ cm}^{-1}$ ,  $1644\text{ cm}^{-1}$  y  $1539\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. A  $1714\text{ cm}^{-1}$  aparece la señal de la tensión del enlace carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) y a  $1153\text{ cm}^{-1}$  la señal de tensión del enlace C-O. Estas últimas señales también corresponden al grupo éster de la molécula de Bionolle.

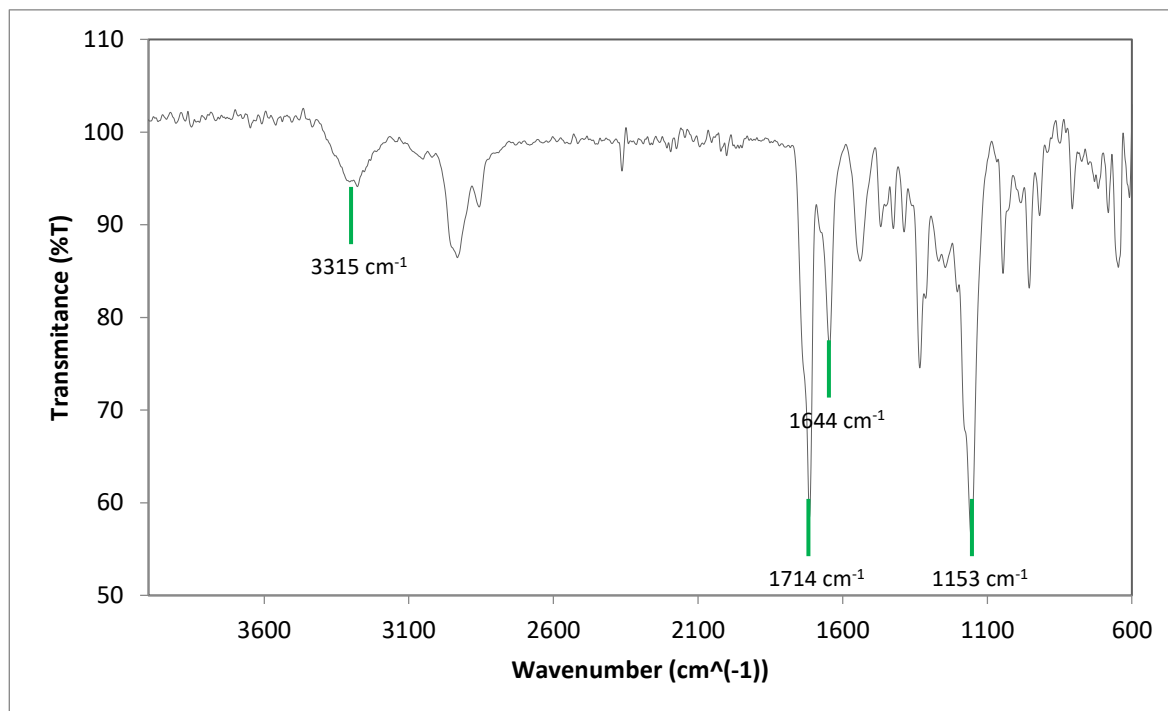


Figura 4.4-9. Espectro FT-IR de la placa porosa de PEA-8L6:BIO

#### 4.4.4. Estudio propiedades térmicas PEA-8L6 y BIO

Puesto que la matriz de fibras de PEA-8L6 se funde en el colector transcurridas unas horas, se ha decidido realizar un estudio mediante DSC para comprobar cuál es su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). Posteriormente, se ha añadido *Bionolle* a la matriz con una mezcla de PEA-8L6:BIO al 50:50 wt% para obtener una matriz de fibras con mejores propiedades térmicas. Se ha realizado también un estudio térmico del *Bionolle* y de la mezcla PEA-8L6:BIO para comprobar cuales son los efectos de la adición del poliéster a la matriz. A continuación, como se puede observar en la Figura 4.4-10, el polímero PEA-8L6 tiene un carácter amorfo, y solo presenta una temperatura de transición vítrea de 11,6 °C, menor que la temperatura ambiente. Por este motivo, la matriz de fibras inicial se fundía en el colector.

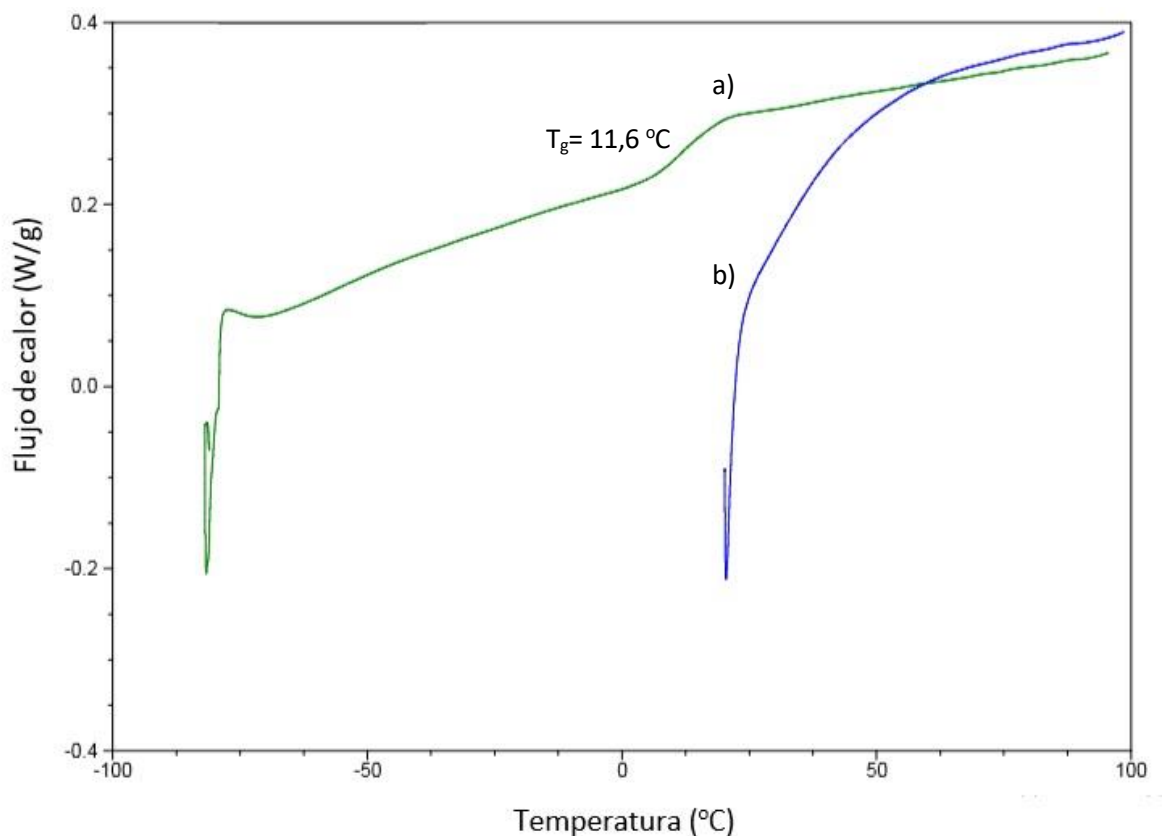


Figura 4.4-10. Calorimetría (DSC) de la PEA-8L6. Primer calentamiento (b), y segundo calentamiento del polímero (a).

Seguidamente, en la Figura 4.4-11, se muestra la calorimetría realizada del *Bionolle*. En este caso, se ha realizado solamente un calentamiento, pues el objetivo era conocer la temperatura de transición vítrea del poliéster. Como se puede observar, la  $T_g$  del BIO es de 34,96 °C, veinte grados mayor que la del PEA-8L6. Puesto que este polímero tiene mejor estabilidad térmica, se ha decidido emplearlo para la matriz.

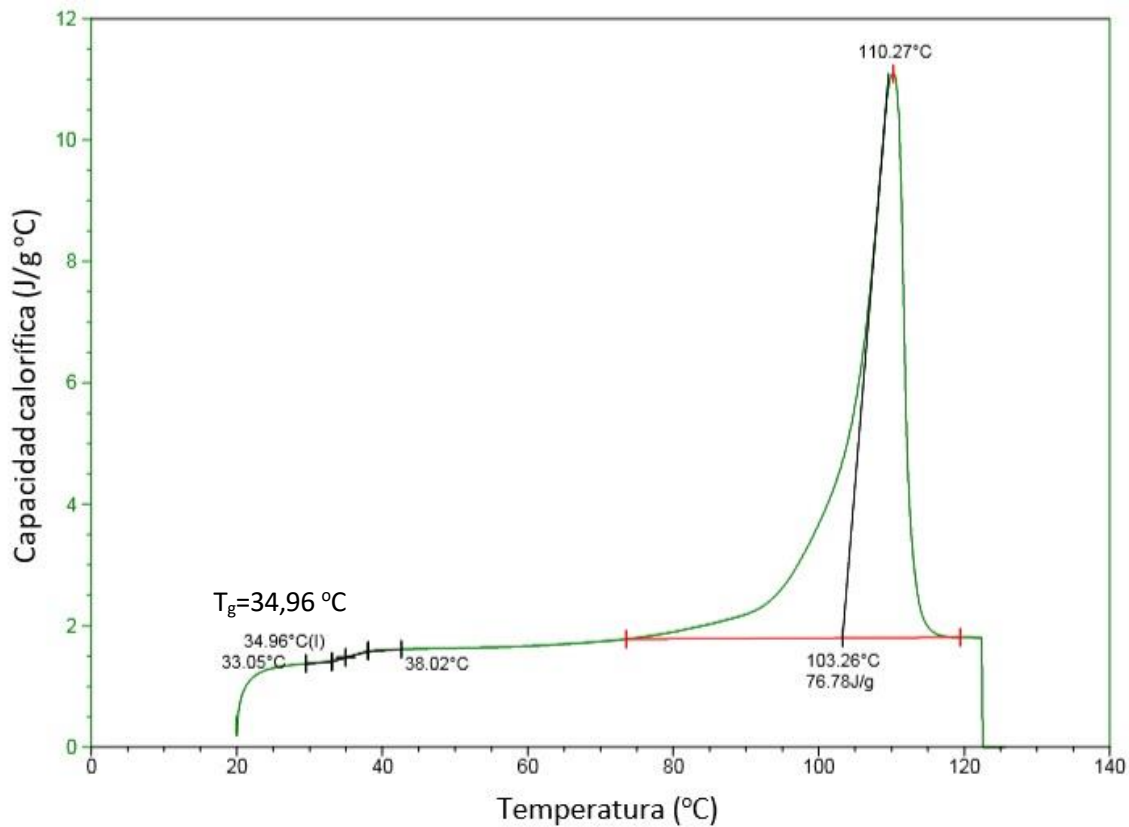


Figura 4.4-11. Primer calentamiento en la calorimetría DSC del Bionolle

Para terminar, se muestra el DSC de la mezcla PEA-8L6:BIO en la Figura 4.4-12. Como se puede observar la temperatura de transición vítrea es ahora de  $33,96^\circ\text{C}$ . Puesto que el calor latente de fusión (calentamiento) es muy similar al calor latente de cristalización (enfriamiento), se puede deducir que el aporte de propiedades térmicas es únicamente del *Bionolle*. El PEA-8L6 se consigue mantener en la matriz de fibras porque el poliéster absorbe ahora todo el calor.

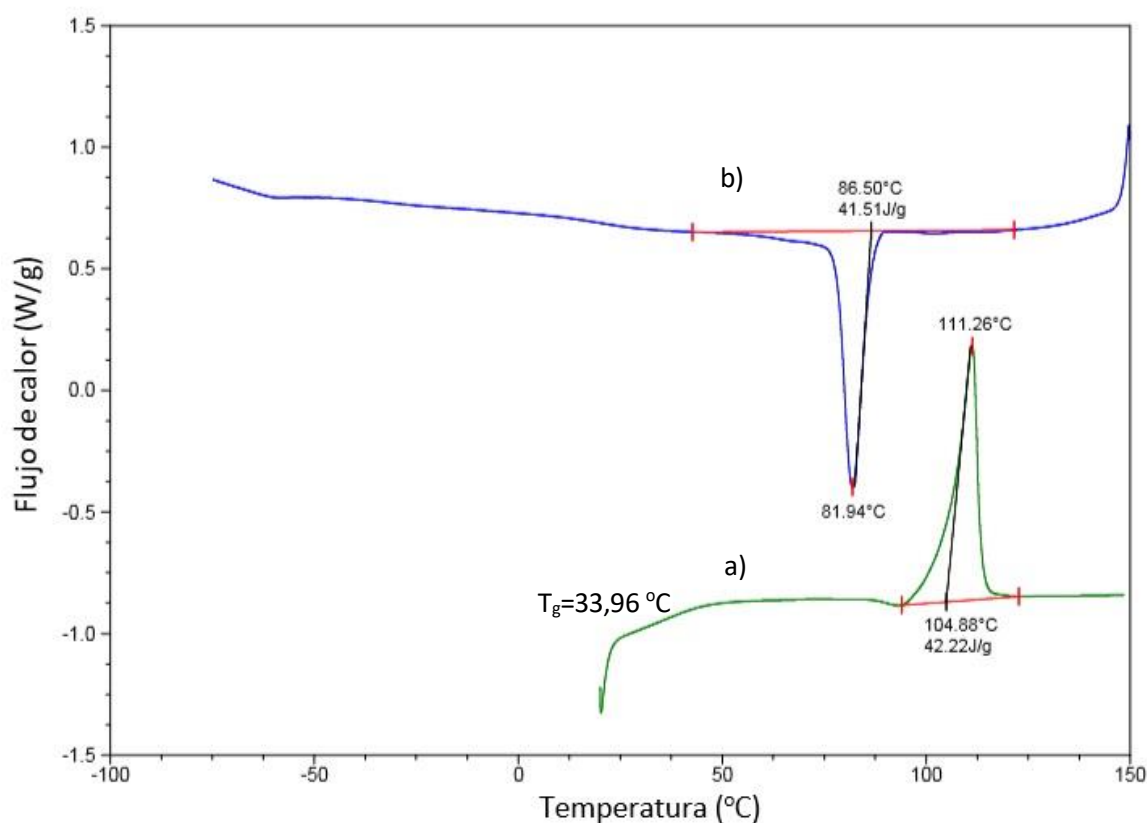


Figura 4.4-12. Calorimetría de la mezcla PEA-8L6:BIO a) Primer calentamiento b) Primer enfriamiento

## 4.5. Análisis morfológico

Todas las matrices obtenidas se han fotografiado mediante SEM, para comprobar el tamaño de los poros en el caso de los hidrogeles y de las placas porosas y el diámetro de las fibras. Todas las imágenes obtenidas han sido utilizadas con fines cuantitativos para realizar un análisis de la distribución del área de los poros y del diámetro de las fibras. Este estudio ayuda a conocer la homogeneidad de las fibras y de los poros en la matriz. Este estudio ha sido realizado con el programa *Smart Tiff* y los valores obtenidos han sido tratados con el programa *Origin*, que permite analizar la distribución de un parámetro y realizar gráficos de esta.

### 4.5.1. Hidrogel PEA-4F4:PEG-DA

Previamente a realizar las fotografías de la superficie de los hidrogeles, se ha medido el grado de hinchamiento de estos, que indica la cantidad de agua que son capaces de absorber. El grado de hinchamiento se muestra en la

Tabla 4.5-1 y como se aprecia el Q del hidrogel 1:2 ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ ) es mayor que el hidrogel de 1:4 ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ ). Esta diferencia se debe, principalmente, a la interconectividad de los poros, y el tamaño de estos. Cuanto mayor sea esta interconectividad y el área de los poros del hidrogel, este tendrá más facilidad en absorber agua y, en consecuencia, mayor será su hinchamiento. Para poder demostrarlo se han realizado fotografías de la superficie mediante SEM.

*Tabla 4.5-1. Grado de hinchamiento de los hidrogeles*

Hidrogel ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ )	Peso en seco (g)	Peso en húmedo (g)	Grado de hinchamiento (x 100 %)
1:4	0,654	10,040	14,351
1:2	0,260	4,722	17,161

A continuación, en la Figura 4.5-1 se muestran micrografías de la superficie de los dos hidrogeles. Como se puede observar, en el hidrogel 1:2 ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ ) los poros se pueden apreciar con más claridad, debido al menor grado de reticulación. Por contrario, en el 1:4 ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ ), puesto que hay más cantidad de PEG-DA, los poros se ven más pequeños. Otro dato importante, es la interconectividad de estos, ya que en este primero se puede apreciar una cierta conexión entre poros, mientras que en el siguiente no. Esta característica facilita la absorción de agua del hidrogel, y es uno de los motivos por el que el hidrogel 1:2 ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ ) tiene un grado de hinchamiento mayor.

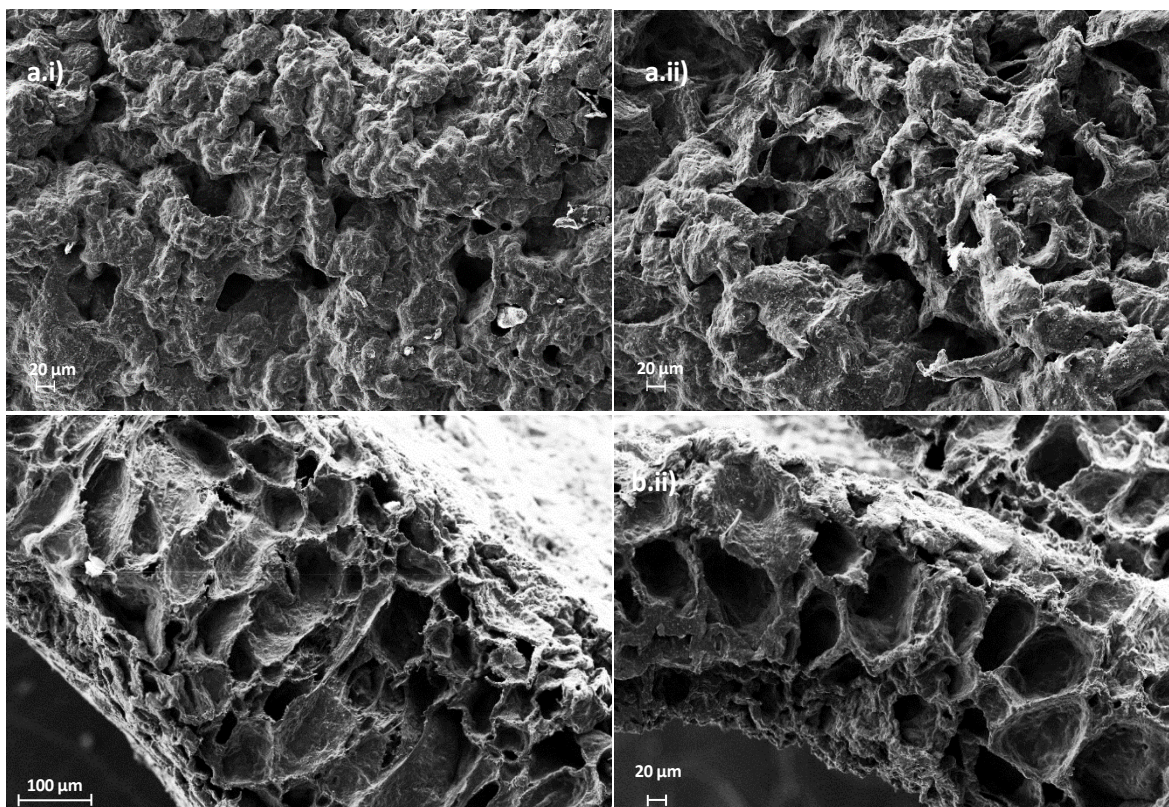


Figura 4.5-1. a) Fotografías mediante SEM de la superficie del hidrogel 1:4 ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ ) b) Fotografías mediante SEM de la superficie del hidrogel 1:2 ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ )

Otro dato que afecta al grado de hinchamiento es el tamaño de los poros. Por este motivo, se ha recogido entre 100-150 muestras del área de los orificios y se ha realizado un estudio de la distribución de estos. En la Figura 4.5-2 se muestra el histograma obtenido para cada hidrogel y en la Tabla 4.5-2 se resume los datos de la distribución. Como se puede apreciar, el tamaño de poros del hidrogel 1:2 ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ ) es mayor que el resto, debido a que la cantidad de PEG-DA es menor y por consiguiente, el grado de reticulación disminuye. Este parámetro, también afecta al grado de hinchamiento, ya que con poros más grandes el hidrogel tiene más capacidad para absorber.

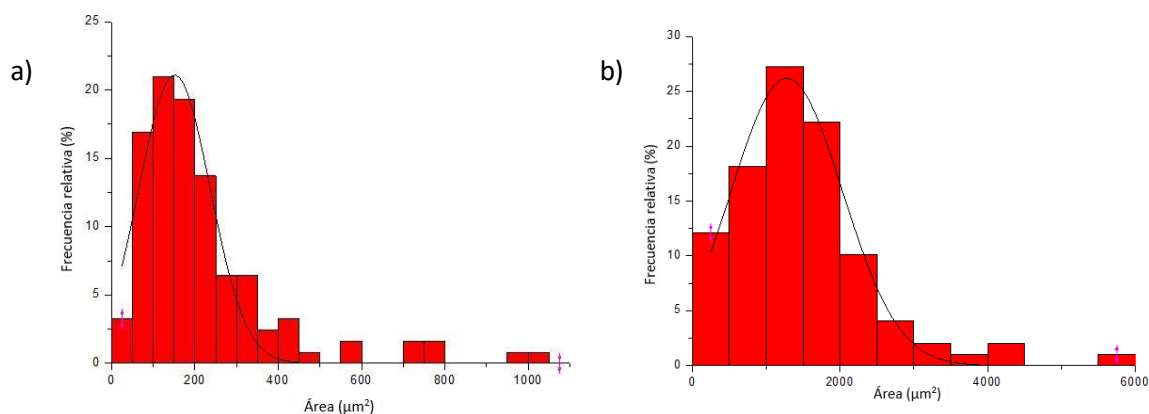


Figura 4.5-2. a) Histograma de la distribución del área de los poros del hidrogel 1:4 ( $w_{\text{PEA-4F4}}:w_{\text{PEG-DA}}$ ) b) Histograma de la distribución del área de los poros del hidrogel 1:2 ( $w_{\text{PEA-4F4}}:w_{\text{PEG-DA}}$ )

Tabla 4.5-2. Tamaño de poro (Área media) en los hidrogeles deshidratados.

Hidrogel ( $w_{\text{PEA-4F4}}:w_{\text{PEG-DA}}$ )	nº de muestras tomadas	Área media ( $\mu\text{m}^2$ )
1:4	124	$171,27 \pm 20$
1:2	100	$1278 \pm 128$

#### 4.5.2. Fibras de PEA-8L6:BIO

En el caso de las fibras, mediante SEM, se puede observar la superficie de éstas, si esta tiene una morfología lisa o rugosa. En la Figura 4.5-3 se muestra una fotografía de una muestra de las fibras y como se puede apreciar, la superficie de las fibras formadas es porosa. Mediante la estandarización de los parámetros operacionales, se ha conseguido obtener una forma de fibras tubular, que era lo deseado. Pese a ello, como se puede observar en la imagen las fibras obtenidas tienen un tamaño muy variado.





Figura 4.5-3. Morfología de las fibras de PEA-8L6:BIO

Con imágenes menos ampliadas y en las que se puede observar una gran cantidad de fibras, se ha podido medir el diámetro de un total de 113 medidas, repartidas en distintas zonas de la matriz. En la Figura 4.5-4 se muestra una fotografía de las fibras junto al gráfico obtenido del análisis. Como se puede apreciar, el diámetro de todas ellas sigue una distribución normal.

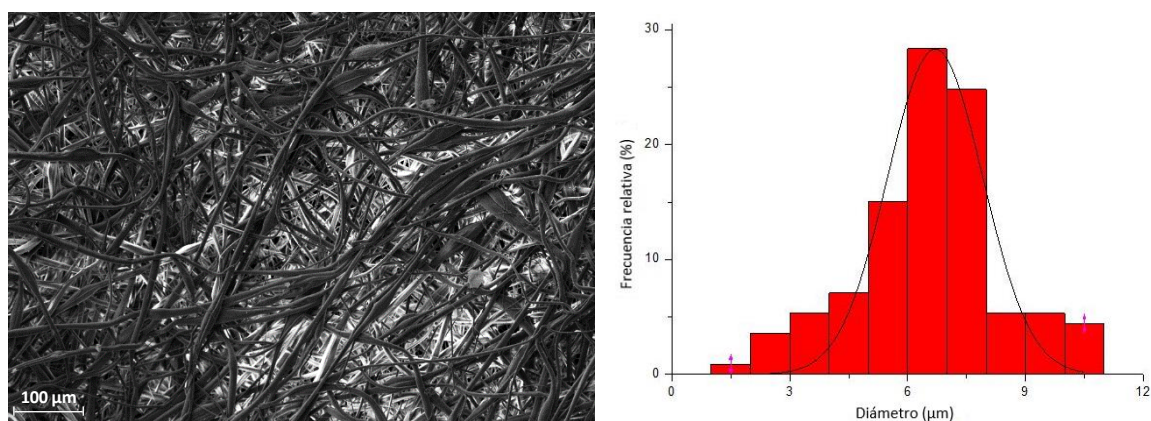


Figura 4.5-4. Morfología y distribución del diámetro de las fibras de PEA-8L6:BIO

En la Tabla 4.5-3 se puede observar el diámetro medio de las fibras que se han obtenido. Y, la distribución de las fibras tiene una desviación importante respecto la media, lo que indica que el tamaño de las fibras es variado.

Tabla 4.5-3. Diámetro medio de las fibras de PEA-8L6:Bionolle

Matriz	nº total de muestras	Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ )
Fibras 8L6:BIO	113	$6,70 \pm 1,76$

#### 4.5.3. Matriz porosa PEA-8L6:BIO mediante *salt-leaching*

Los poros en estas placas se han formado mediante la disolución del agente porogénico, que en este caso es NaCl. Con las imágenes tomadas mediante SEM se ha podido conocer si las partículas de sal se han repartido homogéneamente a lo largo de la matriz o se han acumulado en una zona. Por otro lado, se han tomado imágenes antes y después de sumergir las placas en agua, para comprobar la disolución de la sal. En la Figura 4.5-5 se puede observar que las partículas de sal existentes antes de sumergir la matriz, se han disuelto y, por lo tanto, se ha conseguido formar una matriz porosa apta para el uso como sistema de liberación de fármaco. Por otro lado, se observa que existe una buena interconectividad entre los poros de la matriz. Característica que favorece la proliferación de células en un tejido.

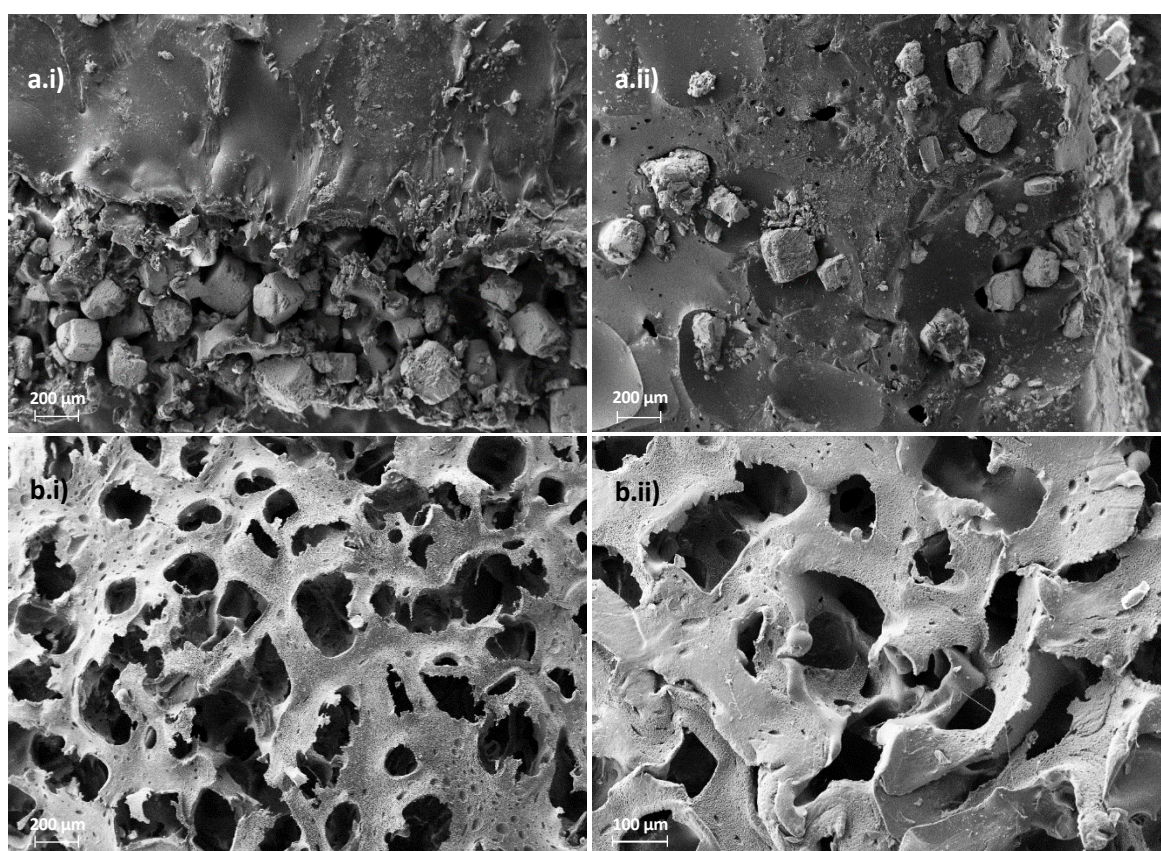


Figura 4.5-5. Fotografías tomadas mediante SEM de la superficie de las placas de PEA-8L6:BIO. a) Antes de la disolución del agente porogénico, b) Después de sumergirlas en agua



En la Figura 4.5-6 se muestra una imagen de la superficie de la placa porosa y el gráfico de la distribución del área de los poros en la matriz. Esta, sigue una distribución normal, lo que indica que las partículas de sal se repartieron homogéneamente a lo largo de la placa y no se acumularon en ninguna zona, creando así poros del mismo tamaño.

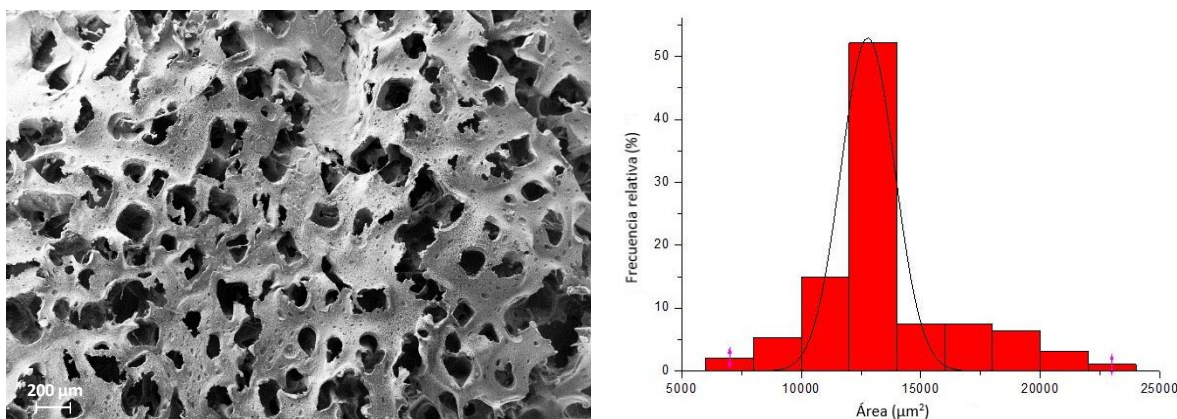


Figura 4.5-6. Morfología y distribución del área de los poros de la matriz de PEA-8L6:BIO obtenida mediante la técnica salt-leaching

Mediante el tamiz de la sal, previamente realizado a la incorporación de esta a la solución polimérica, se ha conseguido obtener un tamaño de poro controlado. En la Tabla 4.5-4 se puede observar el área media de los poros medios en la matriz.

Tabla 4.5-4. Área media de los poros en la matriz porosa de PEA-8L6:BIO mediante salt-leaching

Matriz	nº total de muestras	Área media ( $\mu\text{m}^2$ )
Matriz PEA-8L6:BIO mediante salt-leaching	94	$12786 \pm 3060$

#### 4.6. Estudio de las matrices cargadas con curcumina

Se ha realizado un estudio de liberación de curcumina de las diferentes matrices en un medio de PBS-Etanol al 70% en volumen de EtOH. Se ha escogido este medio, porque según estudios leídos previamente [36], es en el cual la liberación más se asemeja al suero fisiológico utilizado en medicina. Por lo tanto, representa una buena analogía con su uso en el organismo. Para poder determinar la cantidad de curcumina liberada en cada muestra, se requiere obtener previamente una recta patrón para el medio. Esto implica analizar por espectroscopia UV-Vis distintas muestras de curcumina disueltas en el medio, y posteriormente, con las absorbancias medidas a  $430 \text{ nm}^{-1}$ , que es a la longitud

de onda a la que absorbe la curcumina, se realiza una recta de calibrado lo más ajustada posible. En la Figura 4.6-1 se muestra los espectros de las distintas soluciones.

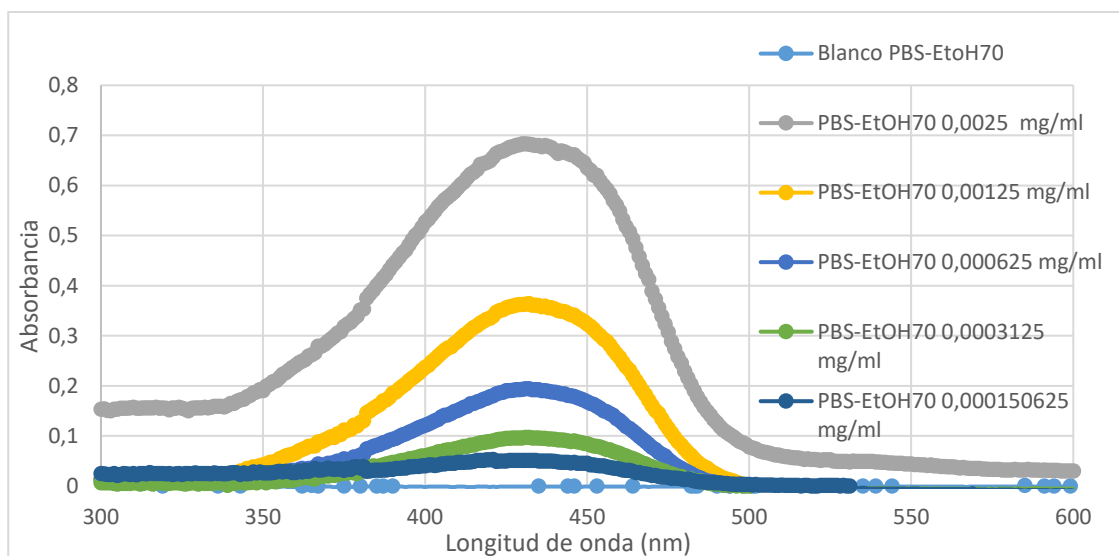


Figura 4.6-1. Espectros obtenidos para la recta de calibrado de curcumina en PBS-EtOH al 70%

Con las distintas absorbancias a  $430\text{ nm}^{-1}$  se ha realizado la recta de calibrado de la Figura 4.6-2. Como se puede apreciar, este ajuste solamente llega a una absorbancia de 0,7, por lo tanto, todas aquellas muestras que han presentado una absorbancia mayor, han tenido que ser diluidas para poder cuantificar el valor de concentración, que luego se multiplica por el factor de dilución para encontrar la concentración real de curcumina en la muestra.

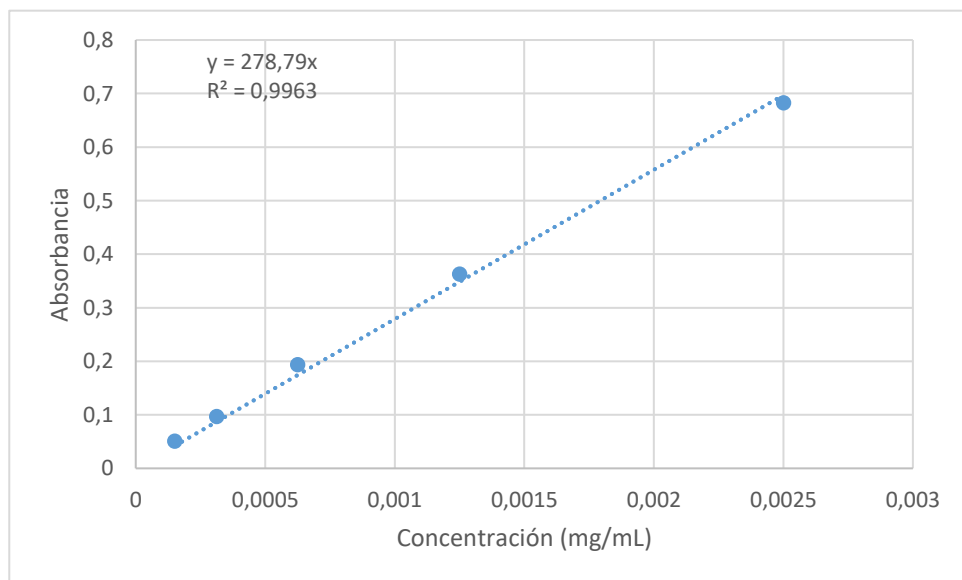


Figura 4.6-2. Recta de calibrado de la curcumina en el medio de PBS-EtOH al 70%

#### 4.6.1. Análisis morfológico

Para evaluar si la adición del fármaco genera algún cambio en la morfología de las matrices estudiadas, se ha realizado un estudio mediante SEM.

##### 4.6.1.1. Hidrogel PEA-4F4:PEG-DA

En la Figura 4.6-3 se muestran imágenes de la superficie de los dos hidrogeles cargados con curcumina. Como se puede observar, la adición del fármaco en la estructura ha cambiado la distribución de los poros, pues ahora, sobre todo en el hidrogel 1:4 ( $w_{\text{PEA-4F4}}:w_{\text{PEG-DA}}$ ), se pueden apreciar un gran número de poros distribuidos a lo largo de la superficie.

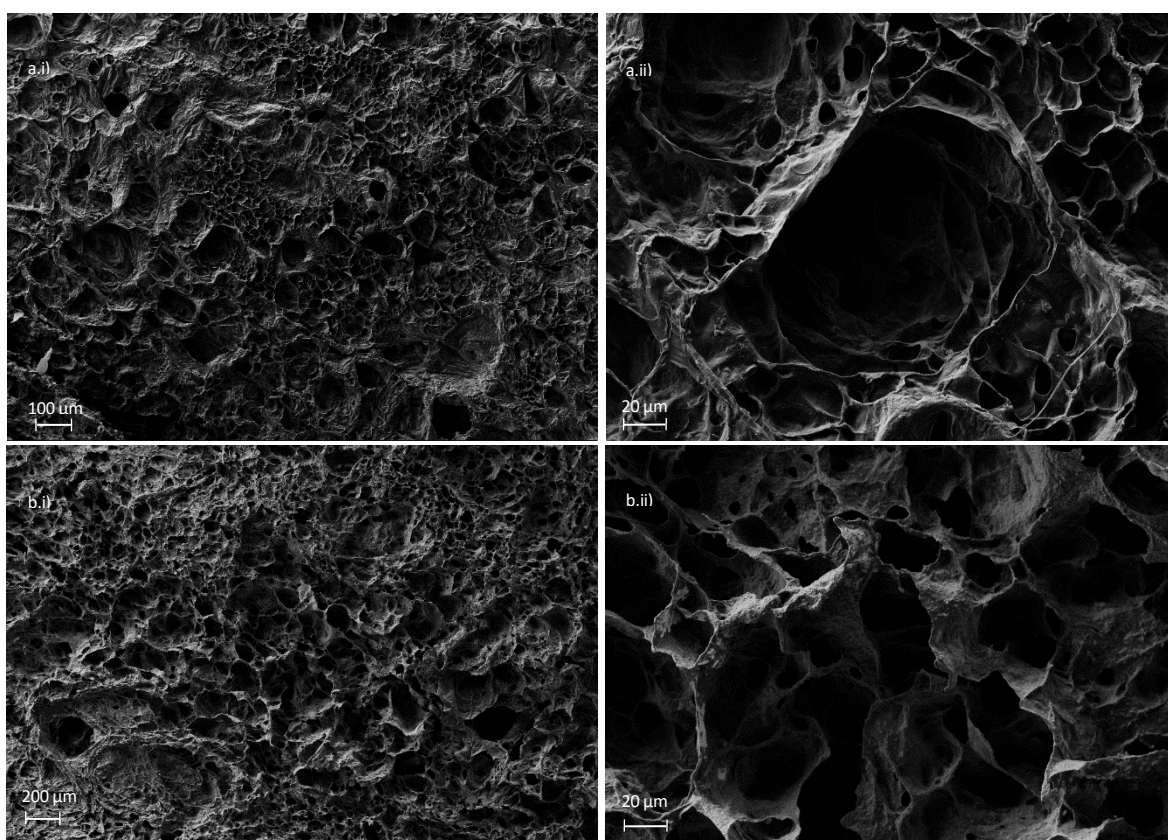


Figura 4.6-3. a) Fotografías mediante SEM de la superficie del hidrogel 1:4 ( $w_{4F4}:w_{\text{PEG-DA}}$ ) cargado con fármaco b) Fotografías mediante SEM de la superficie del hidrogel 1:2 ( $w_{4F4}:w_{\text{PEG-DA}}$ ) cargado con fármaco

En la Figura 4.6-4 se puede observar la distribución del área de los poros, y está muestra un aumento como consecuencia de la adición de la curcumina. En la Tabla 4.6-1 se puede observar la comparativa entre el área media inicial y después de la carga. Los valores muestran que con la incorporación del fármaco a la matriz, el área de los poros aumenta, pues ahora hay una molécula más en la estructura que afecta a la reticulación.

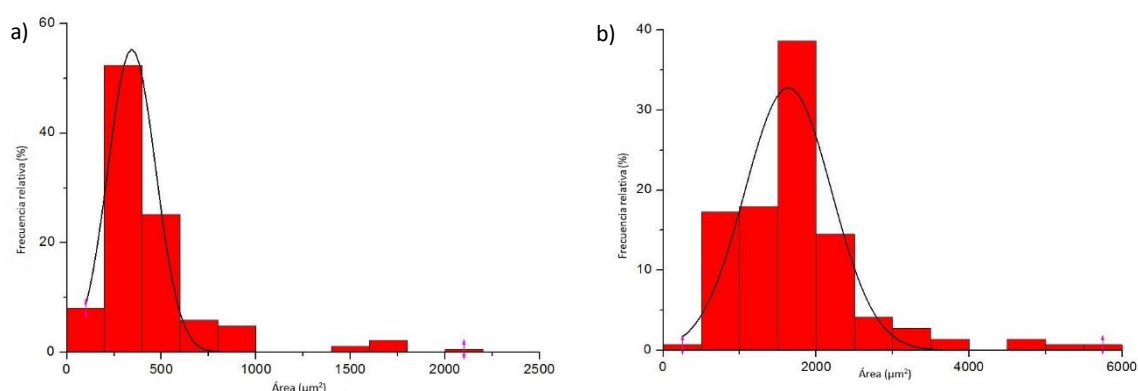


Figura 4.6-4. a) Histograma de la distribución del área de los poros del hidrogel 1:4 ( $w_{PEA-4F4}:w_{PEG-DA}$ ) con carga b) Histograma de la distribución del área de los poros del hidrogel 1:2 ( $w_{PEA-4F4}:w_{PEG-DA}$ ) con carga

Tabla 4.6-1. Comparativa del área de los poros del hidrogel antes y después de añadir el fármaco

Hidrogel ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ )	Área inicial ( $\mu m^2$ )	Área con fármaco ( $\mu m^2$ )
1/4	$171,27 \pm 20$	$343,66 \pm 31$
1/2	$1278 \pm 128$	$1635 \pm 147$

#### 4.6.1.2. Fibras PEA-8L6:BIO

En este caso, se ha decidido realizar un estudio sobre las fibras con más carga de fármaco, puesto que estas son las más propensas a sufrir cambios en su morfología debido a la mayor cantidad de curcumina en la solución. En la Figura 4.6-5 se puede observar que la superficie de las fibras ha pasado de ser porosa a lisa.



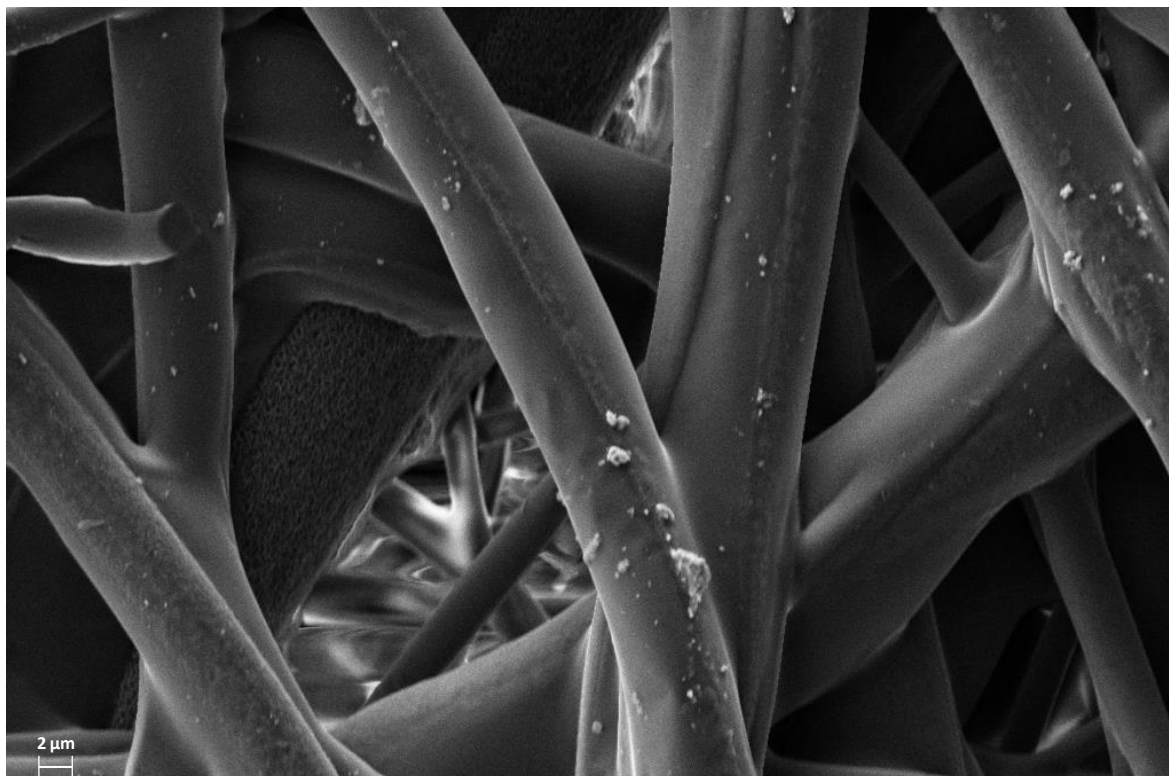


Figura 4.6-5. Morfología de las fibras de PEA-8L6:BIO cargadas al 3% de curcumina

En la Figura 4.6-6 se muestra la distribución de las fibras cargadas al 3% de curcumina y se puede observar cómo estas siguen una distribución normal, lo que indica que el electrohilado se ha realizado en buenas condiciones.

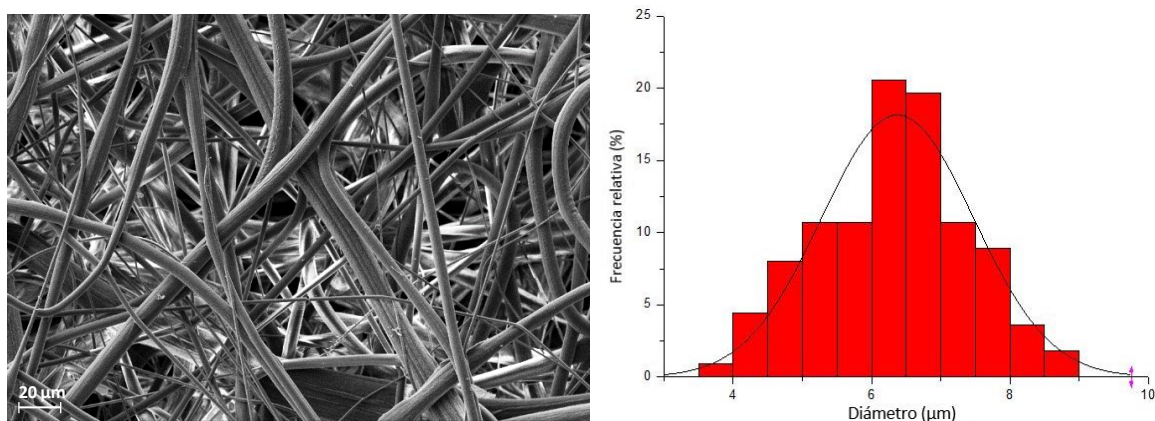


Figura 4.6-6. Morfología y distribución del diámetro de las fibras de PEA-8L6:Bionolle cargadas al 3% de curcumina

En la Tabla 4.6-2 se muestra una comparativa del diámetro medio de las fibras obtenidas inicialmente y las fibras cargadas al 3% de curcumina. La adición de fármaco no afecta al diámetro de las fibras, puesto que los valores obtenidos son similares.

Tabla 4.6-2. Comparativa de diámetros entre las fibras cargadas al 3% de curcumina y las fibras iniciales

Matriz	Diámetro inicial ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro con fármaco ( $\mu\text{m}$ )
Fibras PEA-8L6:BIO	$6,70 \pm 1,76$	$6,37 \pm 1,05$

#### 4.6.1.3. Matriz porosa PEA-8L6:BIO mediante *salt-leaching*

Al igual que en las nanofibras, se ha realizado el estudio de la morfología de las placas porosas con la máxima carga. En la Figura 4.6-7 se puede observar que la superficie de estas no ha variado respecto a la inicial. La adición de fármaco no ha producido ningún efecto en la interconectividad de los poros ni en la distribución de estos sobre la matriz.

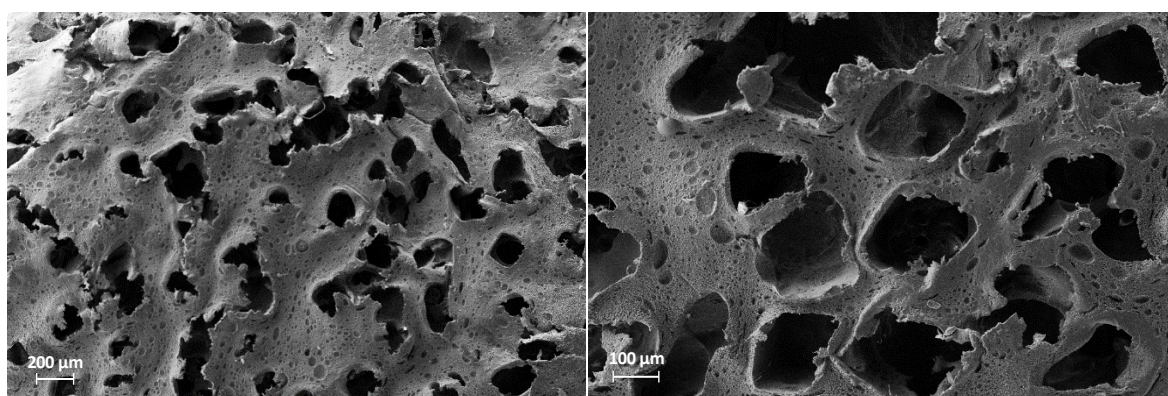


Figura 4.6-7. Morfología de la matriz porosa de PEA-8L6:BIO cargada al 3% de curcumina

En este caso, es muy complicado que la introducción del fármaco pueda provocar cambios en el tamaño de los poros, puesto que estos son derivados de la adición de partículas de sal en la matriz. Pese a ello, se ha realizado un estudio de los poros después de realizar la carga y se muestra la distribución obtenida en la Figura 4.6-8.



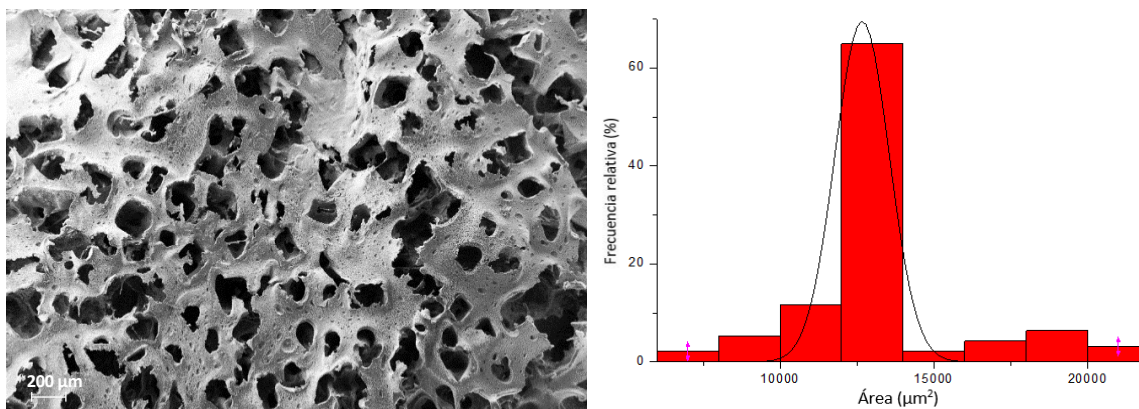


Figura 4.6-8. Morfología y distribución del área de los poros en la matriz de PEA-8L6:BIO cargada al 3% de curcumina

Como se puede observar, la distribución de poros a lo largo de la matriz sigue una tendencia normal, dato que indica que se ha conseguido realizar una placa porosa con fármaco con una distribución de poros homogénea. En la Tabla 4.6-3 se muestra una comparativa entre los poros obtenidos antes de cargar el fármaco y con la carga al 3% y, no se observa diferencia entre estos dos valores, por lo tanto, la adición de curcumina no ha afectado a la porosidad.

Tabla 4.6-3. Comparativa del área media de los poros en las placas porosas de PEA-8L6:BIO iniciales y con carga de fármaco

Matriz	Área inicial ( $\mu\text{m}^2$ )	Área con fármaco ( $\mu\text{m}^2$ )
Matriz porosa 8L6:BIO mediante leaching	$12786 \pm 3060$	$12699 \pm 2794$

## 4.6.2. Estudio de liberación

### 4.6.2.1. Hidrogel PEA-4F4:PEG-DA

Para determinar la cantidad de fármaco liberada se ha graficado el porcentaje de fármaco liberado en función del tiempo de liberación. En la Figura 4.6-9 se muestra el gráfico obtenido para cada uno de los hidrogeles, y como se puede apreciar, la curva obtenida para los dos hidrogeles es parecida. Los dos han liberado aproximadamente el 100% de curcumina transcurridas 7 horas.

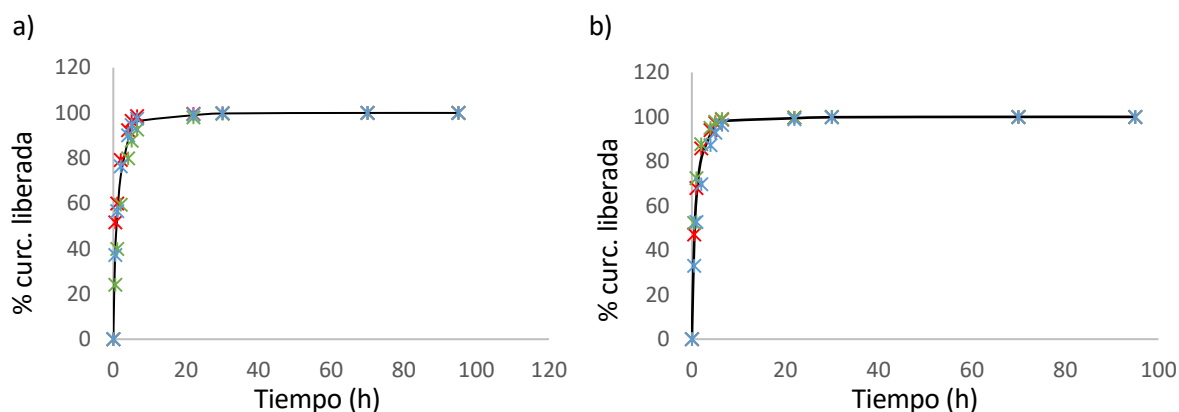


Figura 4.6-9. Representación de la liberación de curcumina en PBS-EtOH al 70% de a) Hidrogel 1:2 ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ ) b) Hidrogel 1:4 ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ )

Puesto que los hidrogeles, no se han cargado con una cantidad de curcumina determinada, es necesario conocer cuanta cantidad de fármaco ha absorbido cada uno, para valorar la capacidad de absorción del fármaco de este material. Por este motivo, se ha anotado la cantidad de curcumina liberada al final de liberación, que es la cantidad total de curcumina que ha absorbido el hidrogel. En la Tabla 4.6-4 se muestra el porcentaje de fármaco absorbido por cada hidrogel.

Tabla 4.6-4. Porcentaje de curcumina absorbido por los distintos hidrogeles

Hidrogel ( $w_{4F4}:w_{PEG-DA}$ )	mg curcumina lib./mg muestra	% curc. absorbido
1:2	0,012936	1,29
1:4	0,015673	1,56

Como se puede observar, los dos hidrogeles tienen una capacidad de absorción del fármaco parecida, entre 1-2% respecto al peso de la muestra. Las moléculas de curcumina se adhieren a la estructura entrecruzada del hidrogel por medio de fuerzas intermoleculares débiles, por este motivo, no afecta la morfología a la cantidad de curcumina que absorbe la estructura.

#### 4.6.2.2. Fibras PEA-8L6: BIO

Para realizar el ensayo de liberación con las matrices de fibras, se han cargado diferentes cantidades de fármaco en la solución polimérica y se ha llevado la mezcla a *electrospinning*. Las cantidades de fármaco añadida se muestran en la Tabla 4.6-5 y, no ha hecho falta cambiar las condiciones de electrohilado.

Tabla 4.6-5. Cantidades de curcumina cargadas en las matrices de PEA-8L6:BIO

Carga (% respecto peso polímeros)	Peso polímeros (g PEA-8L6 + g BIO)	Peso curcumina (g)
0,5	2	0,010
1,5	2	0,030
3	2	0,060

La liberación se ha realizado en un medio de PBS-EtOH al 70% en volumen de Etanol. A continuación, en la Figura 4.6-10, se muestra la curva obtenida para cada liberación del porcentaje de curcumina liberado en función del tiempo.

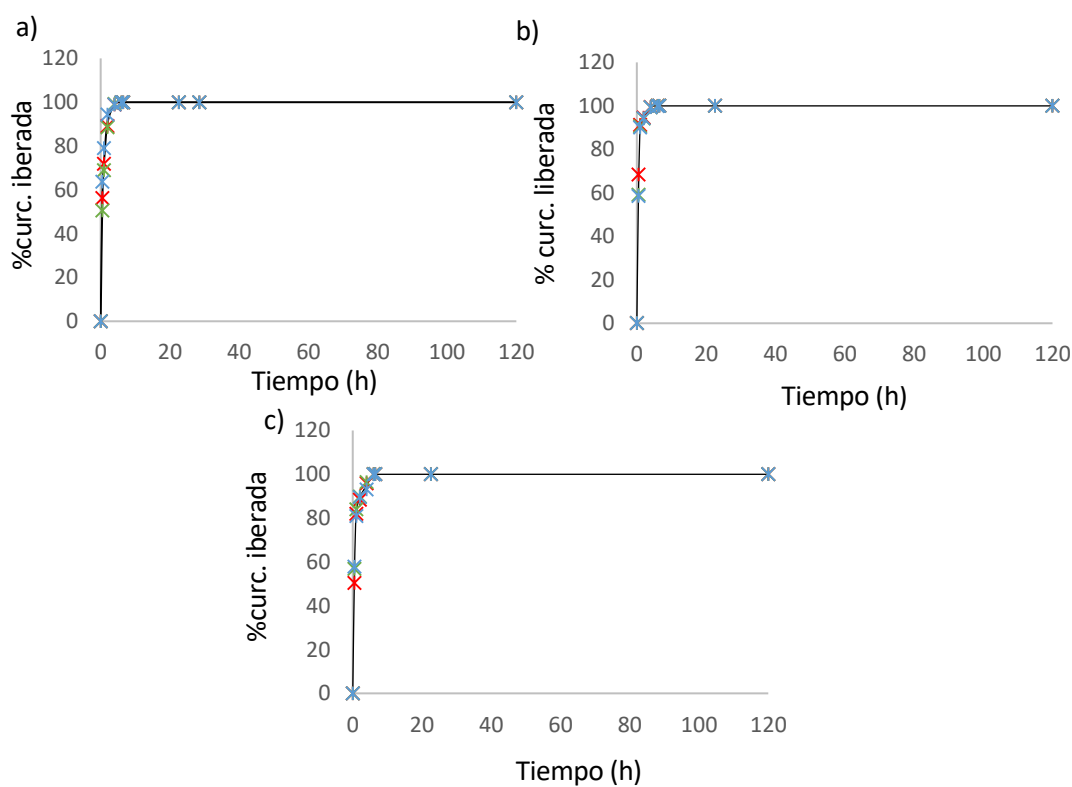


Figura 4.6-10. Porcentaje de curcumina liberado en PBSE-EtOH al 70% en volumen en función del tiempo de las matrices de fibras cargadas al a) 0,5 % b) 1,5 % c) 3 % de curcumina

Se puede observar que las tres curvas son prácticamente iguales. No importa la cantidad de fármaco añadida a la matriz ya que a las 6 horas ya han liberado aproximadamente el 100%. Con el peso

obtenido de curcumina de la liberación final, se ha podido conocer el porcentaje real de curcumina cargada en las muestras. En la Tabla 4.6-6 se muestra un resumen de los resultados.

*Tabla 4.6-6. Porcentajes reales de curcumina en cada matriz de fibras de PEA-8L6: BIO*

Porcentaje teórico de curcumina en la muestra (%)	mg curcumina final/mg muestra	Porcentaje real de curcumina en la muestra (%)
0,5	0,0044 ± 0,0002	0,44 ± 0,02
1,5	0,0148 ± 0,00008	1,45 ± 0,008
3	0,0289 ± 0,0008	2,89 ± 0,08

Los porcentajes reales de curcumina en la muestra son iguales que los iniciales. Esto indica que no se ha perdido fármaco a la hora de elaborar las matrices.

#### **4.6.2.3. Matriz porosa PEA-8L6: BIO mediante *salt-leaching***

Para realizar la liberación con la matriz porosa de PEA-8L6: BIO se han cargado las mismas cantidades de fármaco que en las fibras, que se muestran en la Tabla 4.6-5. La adición de fármaco en las placas no ha afectado al tiempo de disolución de la sal y, después de sumergir las matrices, éstas siguen manteniendo el color naranja característico de la curcumina, por lo tanto, este no se ha perdido durante el proceso. A continuación, en la Figura 4.6-11, se muestran las curvas obtenidas del porcentaje de curcumina liberado en función del tiempo para cada carga.

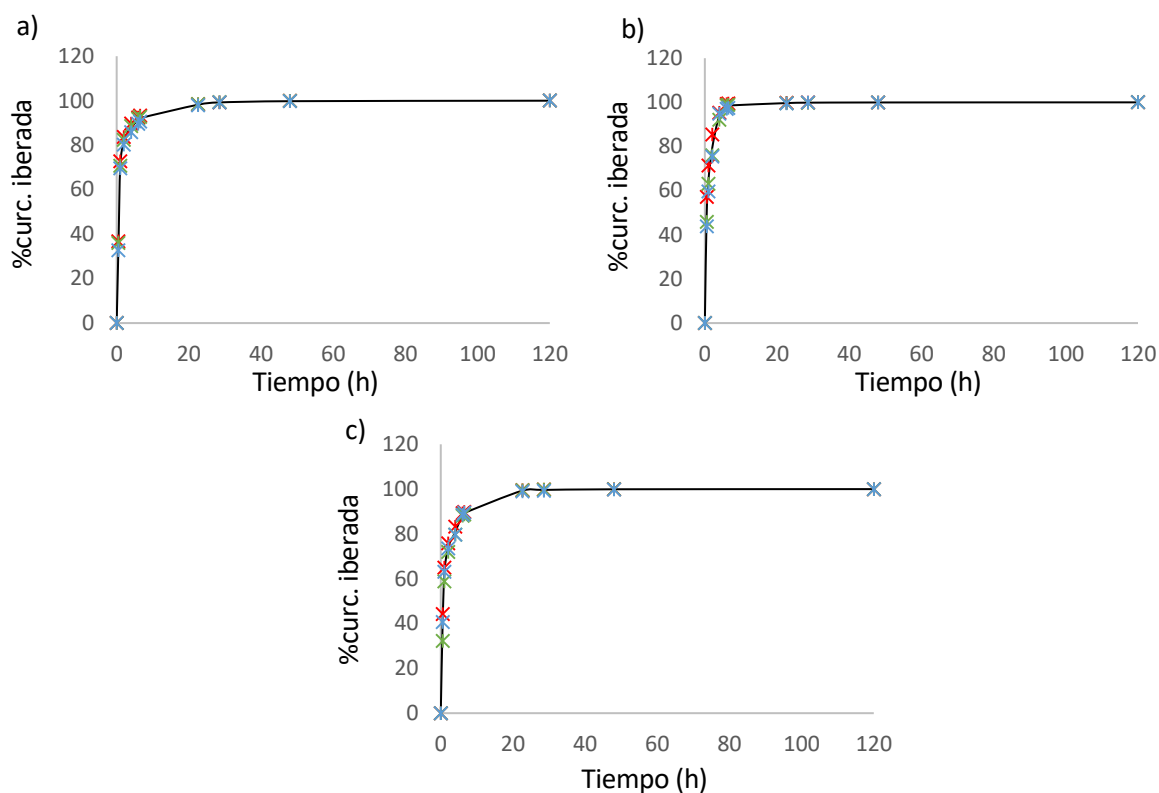


Figura 4.6-11. Porcentaje de curcumina liberado en PBSE-EtOH al 70% en volumen en función del tiempo de las matrices de placas porosas cargadas al a) 0,5 % b) 1,5 % c) 3 % de curcumina

En este caso, tampoco afecta a la velocidad de liberación la cantidad de fármaco añadida a la matriz. Puesto a que todas las curvas son semejantes y todas las matrices, sin importar la carga, han liberado aproximadamente el 100% transcurridas 28 horas. También se ha cuantificado el peso final de la curcumina, para comprobar que el porcentaje curcumina en las muestras es el inicialmente añadido. Los resultados se muestran en la Tabla 4.6-7.

Tabla 4.6-7. Porcentajes reales de curcumina en cada matriz de placas porosas de PEA-8L6: BIO

Porcentaje teórico de curcumina en la muestra (%)	mg curcumina final/mg muestra	Porcentaje real de curcumina en la muestra (%)
0,5	$0,0047 \pm 0,0001$	$0,47 \pm 0,01$
1,5	$0,0144 \pm 0,0001$	$1,44 \pm 0,01$
3	$0,026 \pm 0,0014$	$2,6 \pm 0,14$

Como se puede apreciar, el porcentaje de curcumina obtenido en cada muestra, es semejante al inicialmente añadido.

## Conclusiones

En el presente proyecto se ha obtenido tres tipos de matrices porosas: un hidrogel constituido por la PEA-4F4, una matriz de fibras a partir de la mezcla PEA-8L6:BIO (50:50 wt%) y una matriz porosa mediante la técnica de *salt-leaching* a partir de la mezcla PEA-8L6:BIO:NaCl (25:25 wt%) donde se resuspende un 50 wt% de partículas de NaCl. Todas las matrices se han cargado con el fármaco curcumina y mediante la liberación en un medio de PBS-EtOH al 70 v% de EtOH se ha podido cuantificar esta carga. Teniendo en cuenta los resultados del estudio, se pueden indicar las siguientes conclusiones:




1. El cambio de la proporción másica de PEG-DA en el hidrogel, conlleva una diferencia en el grado de reticulación, y esta se ve reflejada en la morfología. El hidrogel PEA-4F4/PEG-DA (1:4 wt%) presenta unos poros más pequeños que el PEA-4F4/PEG-DA (1:2 wt). Esta diferencia también afecta al grado de hinchamiento, pues el segundo, con poros más grandes, es capaz de absorber más agua.
2. La matriz de fibras de PEA-8L6 obtenida no se ha podido caracterizar morfológicamente pues la poliesteramida no es estable térmicamente. El DSC realizado muestra una temperatura de transición vítrea de 11,56°C.
3. Se ha conseguido obtener una matriz con mejores propiedades térmicas mezclando PEA-8L6 y BIO 50:50 wt%. El DSC confirma los resultados pues la temperatura de transición vítrea de la matriz fue de 33,96 °C.
4. Se ha conseguido estandarizar los parámetros operacionales del *electrospinning* y de la solución polimérica, para obtener una matriz de fibras de PEA-8L6:BIO de superficie rugosa en buenas condiciones.
5. Mediante el uso de la técnica de *salt-leaching* se ha podido controlar el tamaño de poro y obtener así una matriz porosa con una distribución del área de los poros homogénea y una gran interconectividad entre estos.
6. Los hidrogeles cargados con curcumina presentan un área porosa mayor. En el caso de las fibras, se ha observado que la adición del fármaco provoca que la superficie de éstas pase a ser lisa, sin afectar al diámetro. La matriz porosa obtenida mediante *salt-leaching* no se ve afectada por la adición de curcumina.
7. El estudio de liberación de la curcumina en el medio de PBS-EtOH al 70% en volumen de Etanol demuestra que todas las matrices liberan controladamente el fármaco. Con el peso de fármaco obtenido finalmente se ha podido cuantificar la carga de todas las matrices.
8. El análisis muestra que en la matriz de fibras el fármaco es liberado en menor tiempo que el hidrogel y la matriz porosa obtenida mediante *salt-leaching* que tienen un perfil de liberación más lento.

## 5. Análisis del impacto ambiental








En el siguiente apartado se evalúa el impacto ambiental y los posibles efectos en la salud humana derivados del uso de sustancias químicas. Se ha seguido el reglamento de registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas (REACH). Este, se aplica a todas las sustancias químicas que hay en el mercado, y, por lo tanto, los fabricantes, importadores, distribuidores y usuarios intermedios deben cumplirlo.

Se considera que las obligaciones a seguir en este trabajo son las de un usuario intermedio, que es aquel que utiliza las sustancias o mezclas químicas en una actividad empresarial o profesional. Por lo tanto, hay que adoptar las medidas de gestión de riesgos que puedan detallarse en las fichas de los datos de seguridad de las sustancias que se necesitan. A continuación, en la Tabla 5. 1 se muestran las sustancias peligrosas utilizadas para la realización del proyecto, las indicaciones y los pictogramas. En la Tabla 5. 2 se explica el significado de cada código.

Tabla 5. 1. Coste de personal

Sustancia química	Pictogramas	Indicaciones de peligro
Ácido p-toluensulfónico		H315 H319 H335
Butanol		H226 H302 H315 H318 H335 H336
cis-buten-1,4-diol		H302



Cloroformo		H302 H315 H319 H331 H351 H361 H373
Cloruro de succinilo		H314
Diclorometano		H315 H319 H336 H351
DMA		H312 H319 H332
DMSO		H319
Etanol		H225 H319
n-Hexano		H225 H304 H315 H336 H361 H373 H411







Tolueno	  	H225 H304 H315 H336 H361 H373 H401
Trietilamina	  	H225 H302 H311 H314 H331 H335

Tabla 5. 2. Significado de los códigos de peligro

Código	Significado
H225	Líquido y vapores muy inflamables
H226	Líquidos y vapores inflamables
H302	Nocivo en caso de ingestión
H304	Puede ser mortal en caso de ingestión y penetración en las vías respiratorias
H311	Tóxico en contacto con la piel
H314	Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves
H315	Provoca irritación cutánea
H318	Provoca lesiones oculares graves

H319	Provoca irritación ocular grave
H331	Tóxico en caso de inhalación
H335	Puede irritar las vías respiratorias
H336	Puede provocar somnolencia o vértigo
H351	Se sospecha que provoca cáncer
H361	Susceptible de perjudicar la fertilidad o dañar el feto
H373	Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas
H401	Tóxico para los organismos acuáticos
H411	Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos

Como se puede observar, en este trabajo se han utilizado un gran número de sustancias peligrosas para el medioambiente. Pese a ello, se han hecho servir en poca cantidad. Donde más sustancias dañinas se han utilizado ha sido en la elaboración de los hidrogeles de PEA-4F4:PEGDA. Para la elaboración del monómero precursor se ha necesitado Tolueno como medio de reacción y DMSO y Butanol para purificar el producto obtenido, estos últimos en mayor cantidad debido a que se ha tenido que recrystallizar más de una vez. Tanto el cloruro de succinilo, como el ácido p-toluensulfónico y el cis-buten-1,4-diol son productos utilizados como reactivos, motivo por el cual los residuos generados por estos son mínimos ya que la gran parte de ellos reacciona para formar el polímero. El diclorometano es utilizado como medio de reacción para la formación del polímero PEA-4F4, y como se ha podido observar se trabaja con cantidades pequeñas. Para la elaboración del PEG-DA se requiere también Tolueno como medio de reacción y trietilamina y DMA para facilitar que se lleve a cabo esta. El n-Hexano es utilizado para precipitar este compuesto y se utiliza aproximadamente 1 L. El ácido clorhídrico es generado en diversas reacciones del trabajo. Todos los residuos líquidos generados en la elaboración de los diferentes compuestos se han vertido en los envases correspondientes de residuos tóxicos, que son de polietileno de alta densidad (HDPE), para su posterior tratamiento, pese a ello, las cantidades generadas no llegan a ser significativas como para producir un impacto ambiental.

Para reducir las emisiones de sustancias volátiles, se ha trabajado siempre utilizando las campanas extractoras durante la elaboración de los polímeros y para la evaporación del solvente de las fibras y las placas porosas, donde se utiliza diclorometano y cloroformo.

## 6. Evaluación económica del proyecto

Como apartado final, se muestra un análisis económico de lo que ha sido este proyecto. Para realizar este estudio, se han dividido los costes en 4 categorías:

1. Costes de productos químicos y material de laboratorio necesarios para la elaboración de las matrices porosas. Estos costes se recogen en la Tabla 6. 1.

Tabla 6. 1. Costes de productos y materiales

	Producto	Cantidad utilizada	€/cantidad	Total (€)
Hidrogel PEA- 4F4/PEG-DA	Ácido p-toluensulfónico	0,30 kg	186,2	55,86
	Butanol	0,50 L	78,1	39,05
	Carbonato sódico	5,00 g	0,0284	0,14
	cis-Butene-1,4-diol	10,00 mL	0,2534	2,53
	Cloruro de acrilóilo	1,00 mL	1,704	1,70
	Cloruro de succinilo	3,00 mL	4,84	14,52
	Diclorometano	0,50 L	100	50,00
	DMA	6,00 mL	0,1665	1,00
	DMSO	0,50 L	149,04	74,52
	Etanol	0,20 L	61,87	12,37
	Hexano	0,70 L	24,52	17,16
	Igracur	0,06 g	5,41	0,35
	L-fenilalanina	25,00 g	1,11	27,75
	PEG	12,00 g	0,0483	0,58
	Tolueno	0,50 L	83	41,50
	Trietilamina	2,00 mL	0,274	0,55
Fibras PEA- 8L6/Bionolle	Bionolle	8,00 g	0,01529	0,12
	Cloroformo	40,00 mL	0,0829	3,32
	PEA-8L6	8,00 g	0,011	0,088
Placas porosas PEA- 8L6/Bionolle	Bionolle	4,00 g	0,01529	0,06
	Cloroformo	20,00 mL	0,0829	1,66
	Cloruro de sodio	8,00 g	0,051	0,41
	PEA-8L6	4,00 g	0,011	0,044
Liberación	Curcumina	1,00 g	0,406	0,41
	Etanol	0,53 L	61,87	32,48
	PBS	5,00 g	0,34	1,70
Precio total de productos químicos empleados				379,87
Material de laboratorio empleado (20 % del precio productos químicos)				75,91
<b>TOTAL</b>				<b>455,78</b>

2. Costes de personal que se muestran en la Tabla 6. 2

Tabla 6. 2. Coste de personal

	Cantidad (h)	Precio (€/h)	Total (€)
Estudio previo y documentación	100	10	1000
Experimentación	500	15	7500
Análisis de resultados	150	20	3000
<b>TOTAL</b>			<b>11500</b>

3. Coste de equipos. Es el coste que deriva del uso de los equipos a lo largo del proyecto. Para calcularlo se ha tenido en cuenta el precio del equipo (€), la amortización (años), los usuarios que utilizan cada equipo y la duración de la parte experimental del trabajo (7 meses). El precio final se ha calculado con la ecuación 2 y los resultados se muestran en la Tabla 6. 3

$$Total = \frac{\left( \frac{Precio}{Amortización} \right) * Duración\ parte\ experimental}{Usuarios} \quad (2)$$

Tabla 6. 3. Coste de equipos

Equipo	Precio	Amortización (años)	Usuarios	Total (€)
FT-IR	25000	10	12	121,5
DSC	62000	12	6	502,0
UV	16500	10	10	96,2
RMN	240000	22	9	706,7
Electrospinning	3000	10	5	35,0
SEM	210000	20	10	612,2
MO	8000	15	5	62,2
Cámara digital MO	3000	10	5	35,0
Lámpara UV	200	5	3	7,8
<b>TOTAL</b>				<b>2178,4</b>

4. Otros gastos generales como el suministro de agua, luz, gases, ... Así como la suma de algunos imprevistos. Para cuantificar el total se ha considerado el 10% del coste total de la actividad. El resultado se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

Tabla 6. 4. Coste de gastos generales

	Precio (€)
Coste Productos y material	455,78
Coste personal	11500
Coste equipos	2178,4
Coste actividad	14134
<b>TOTAL</b>	<b>1413,4</b>
<b>Gastos generales (+10% actividad)</b>	

Con todos estos costes, el coste total del proyecto se calcula en la Tabla 6. 5

Tabla 6. 5. Coste total

	Precio (€)
Coste Productos y material	455,78
Coste personal	11500
Coste equipos	2178,4
<b>COSTE ACTIVIDAD</b>	14134
Gastos generales	1413,4
<b>TOTAL</b>	15547,4

El coste total del proyecto de fin de grado es de 15547,4 €





## 7. Bibliografía

- [1] M. Beltrán and A. Marcilla, "Estructura y propiedades de los polímeros," *Tecnol. polímeros procesado y propiedades*, p. 25, 2012.
- [2] O. Nuyken and S. D. Pask, "Ring-opening polymerization-An introductory review," *Polymers (Basel)*, vol. 5, no. 2, pp. 361–403, 2013.
- [3] E. Armelín, J. Puiggalí, and Universitat Politècnica de Catalunya. Departament d'Enginyeria Química., "Síntesis y caracterización de nuevas poliesteramidas : estudio de sus propiedades," *TDX (Tesis Dr. en Xarxa)*, 2002.
- [4] L. A. Brumovsky, "Química del almidón," p. 10, 2010.
- [5] C. Á.-L. and U. M. M.-R. P. F. Gañán-Rojo, C. I. Castro-Herazo, A. Restrepo-Osorio, J. A. Velásquez-Cock, C. E. Correa-Hernández, C. A. Molina-Ramírez, R. Zuluaga-Gallego, L. M. Vélez-Acosta, "Celulosa : un polímero de siempre con mucho futuro," *Rev. Colomb. Mater.*, no. 11, pp. 1–4, 2017.
- [6] L. Avérous, "Polylactic acid: synthesis, properties and applications," *Monomers, Polym. Compos. from Renew. Resour.*, pp. 433–450, 2008.
- [7] E. Göktürk and H. Erdal, "Biomedical applications of polyglycolic acid (PGA)," *SAÜ Fen Bilim. Enstitüsü Derg.*, vol. 21, no. 6, pp. 1–1, 2017.
- [8] M. Ayyoob, D. H. Lee, J. H. Kim, S. W. Nam, and Y. J. Kim, "Synthesis of poly(glycolic acids) via solution polycondensation and investigation of their thermal degradation behaviors," *Fibers Polym.*, vol. 18, no. 3, pp. 407–415, 2017.
- [9] V. Guarino, G. Gentile, L. Sorrentino, and L. Ambrosio, *Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications*. 2017.
- [10] A. Díaz, R. Katsarava, and J. Puiggalí, "Synthesis, properties and applications of biodegradable polymers derived from diols and dicarboxylic Acids: From Polyesters to poly(ester amide)s," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 5, pp. 7064–7123, 2014.
- [11] M. Puchalski, G. Szparaga, T. Biela, A. Gutowska, S. Sztajnowski, and I. Krucińska, "Molecular and supramolecular changes in polybutylene succinate (PBS) and polybutylene succinate adipate (PBSA) copolymer during degradation in various environmental conditions," *Polymers (Basel)*, vol. 10, no. 3, pp. 1–12, 2018.
- [12] A. Rodriguez-Galan, L. Franco, and J. Puiggali, "Degradable poly(ester amide)s for biomedical applications," *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 1, pp. 65–99, 2011.
- [13] "Polydepsipeptides, 4")," vol. 53, pp. 23–53, 1975.

- [14] L. T. Lim, R. Auras, and M. Rubino, "Processing technologies for poly(lactic acid)," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 33, no. 8, pp. 820–852, 2008.
- [15] E. M. Ahmed, "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review," *J. Adv. Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 105–121, 2015.
- [16] S. Ma, B. Yu, X. Pei, and F. Zhou, "Structural hydrogels," *Polymer (Guildf.)*, vol. 98, pp. 516–535, 2016.
- [17] A. A. Almetwally, M. El-Sakhawy, M. H. Elshakankery, and M. H. Kasem, "Technology of nano-fibers: Production techniques and properties," *J. Text. Assoc.*, vol. 78, no. 1, pp. 5–14, 2017.
- [18] "Scaffolding in Tissue Engineering." Taylor & Francis Group, 2006.
- [19] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar, "Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review," *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2011, no. ii, 2011.
- [20] Virginia Peña Blaque, "Sistemas de liberación controlada de medicamentos. Aplicaciones biomédicas," 2016.
- [21] M. Fern, "SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA Conceptos fundamentales 2007," 2007.
- [22] J. Frank, B. Hincapié, and J. Andrea, "Aptámeros : agentes diagnósticos y terapéuticos," 2012.
- [23] A. J. Ruby, G. Kuttan, K. Dinesh Babu, K. N. Rajasekharan, and R. Kuttan, "Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids," *Cancer Lett.*, vol. 94, no. 1, pp. 79–83, 1995.
- [24] R. C. Lantz, G. J. Chen, A. M. Solyom, S. D. Jolad, and B. N. Timmermann, "The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production," *Phytomedicine*, vol. 12, no. 6–7, pp. 445–452, 2005.
- [25] M. Shi, Q. Cai, L. Yao, Y. Mao, Y. Ming, and G. Ouyang, "Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells," *Cell Biol. Int.*, vol. 30, no. 3, pp. 221–226, 2006.
- [26] P. Ning *et al.*, "High encapsulation and localized delivery of curcumin from an injectable hydrogel," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 83, no. August 2017, pp. 121–129, 2018.
- [27] K. Guo, C. C. Chu, E. Chkhaidze, and R. Katsarava, "Synthesis and characterization of novel biodegradable unsaturated poly(ester amide)s," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 43, no. 7, pp. 1463–1477, 2005.
- [28] R. Katsarava, V. Beridze, N. Arabuli, D. Kharadze, C. C. Chu, and C. Y. Won, "and Study of Regular Poly ( ester amide ) s Based on Bis ( alpha -amino acid ) alpha, omega -Alkylene Diesters , and Aliphatic Dicarboxylic Acids," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 37, pp. 391–407, 1999.
- [29] N. Paredes, A. Rodríguez-Galán, and J. Puiggalí, "Synthesis and characterization of a family of biodegradable poly(ester amide)s derived from glycine," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 36, no. 8, pp. 1271–1282, 1998.
- [30] K. Guo and C. C. Chu, "Synthesis and characterization of novel biodegradable unsaturated

- poly(ester amide)/poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 43, no. 17, pp. 3932–3944, 2005.
- [31] X. Pang and C. C. Chu, "Synthesis, characterization and biodegradation of poly(ester amide)s based hydrogels," *Polymer (Guildf)*, vol. 51, no. 18, pp. 4200–4210, 2010.
- [32] L. M. Duque Sánchez, L. Rodríguez, and M. López, "Electrospinning: The Nanofibers Age," *Rev. Iberoam. Polímeros Vol. Iber. Polímeros*, vol. 14, no. 141, pp. 10–27, 2014.
- [33] M. Rico, "Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución: una herramienta fundamental en Química y Biología Estructural," *An. la Real Soc. Española Química*, vol. 107, no. 1, pp. 46–57, 2011.
- [34] J. L. S. Martínez, "Instrumentacion y métodos de análisis químico. Espectroscopia infrarroja," p. 35, 2009.
- [35] S. SURINACH, M. BARO, S. BORDAS, N. CLAVAGUERA, and M. CLAVAGUERA-MORA, "La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la ciencia de materiales," *Boletín la Soc. Española Cerámica y Vidr.*, vol. 31, no. 1, pp. 11–17, 1992.
- [36] R. Zurita, J. Puiggalí, and A. Rodríguez-Galán, "Triclosan release from coated polyglycolide threads," *Macromol. Biosci.*, vol. 6, no. 1, pp. 58–69, 2006.